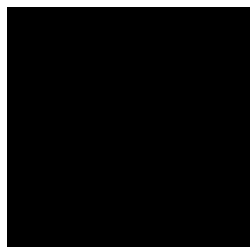


Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy



Mgr. Barbora Valášková

LÉČBA MÍŠNÍHO PORANĚNÍ CÍLENÁ NA SEKUNDÁRNÍ POŠKOZENÍ

TREATMENT OF SPINAL CORD INJURY TARGETTING SECONDARY MECHANISMS

Disertační práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavla Jendelová, PhD.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 15.5.2019

BARBORA VALÁŠKOVÁ

Identifikační záznam:

VALÁŠKOVÁ, Barbora. *Léčba míšního poranění cílená na sekundární poškození. [Treatment of spinal cord injury targeting secondary mechanismus]*. Praha, 2019. 94 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR v.v.i. Školitel: doc. RNDr. Pavla Jendelová, PhD.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D. za odborné vedení a příjemnou spolupráci. Dále bych ráda poděkovala kolegům z Ústavu experimentální medicíny za cenné rady a spolupráci. Chtěla bych také poděkovat manželovi, rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Abstrakt

Traumatické míšní poranění (MP) je závažný stav s často velmi vážnými a trvalými následky. V současné době neexistuje žádná efektivní léčba. Po počátečním mechanickém poranění míchy se spouští kaskáda mnoha sekundárních dějů, které dále rozšiřují a zhoršují poškození. Tato předkládaná dizertační práce se zaměřuje na potenciální terapeutický vliv fotobiomodulace, přírodních protizánětlivých sloučenin epigallocatechin-3-galátu (EGCG), kurkuminu, jejich kombinace a čisté syntetické formy kurkuminu nazvané nanokurkumin na následky experimentálního MP u potkanů.

Fotobiomodulace s využitím dvou synchronizovaných vlnových délek 808 a 905 nm vedla k rychlejšímu funkčnímu zotavení po MP, což bylo hodnoceno sérií lokomotorických testů a somatosenzorického plantar testu. Skupina léčená fotobiomodulací si vedla lépe ve všech sledovaných testech. Výsledky histopatologické analýzy ukázaly pozitivní vliv léčby na zachování šedé i bílé hmoty a naše výsledky rovněž naznačují upregulaci prospěšných M2 mikroglií/makrofágů po léčbě, což bylo hodnoceno imunohistochemickou a RT-qPCR analýzou. Výsledky ukazují, že fotobiomodulace je nadějnou neinvazivní metodou pro zlepšení motorických funkcí a ochranu míšní tkáně po MP.

EGCG a kurkumin jsou přírodní sloučeniny známé v čínské medicíně již po staletí. Ve druhé části práce byl sledován jejich neuroprotektivní a imunomodulační vliv na sekundární následky MP. Obě sloučeniny ovlivnily zánětlivou reakci a podílely se na regeneraci tkáně díky změnám hladin cytokinů a ovlivněním tvorby gliové jizvy. Nepozorovali jsme synergický efekt kombinace těchto dvou látek. Syntetický nanokurkumin nabízí novou možnost, jak zvýšit biologickou dostupnost kurkuminu v těle. Po léčbě nanokurkuminem jsme u potkanů našli změny v pohybu zadních končetiny, zvýšené zachování bílé míšní hmoty a sníženou tvorbu gliové jizvy. Nanokurkumin má rovněž imunomodulační vlastnosti, které zlepšují zánětlivou odpověď v místě léze brzy po vzniku MP.

Naše výsledky ukazují potenciál všech sledovaných terapií zmírňovat následky traumatického poranění míchy.

Klíčková slova: míšní poranění, fotobiomodulace, EGCG, kurkumin, neuroregenerace

Abstract

Traumatic spinal cord injury (SCI) is severe condition with devastating long-lasting consequences. There is still no available treatment. After initialing mechanical trauma, there is a huge cascade of secondary reactions which amplifies the damage. This thesis is focused on potential therapeutic effect of photobiomodulation, natural anti-inflammatory compounds epigallocatechin-3-gallate (EGCG), curcumin, their combination and extrapure synthetic form of curcumin called „nanocurcumin“ on impacts of experimental model of SCI in rats.

Photobiomodulation using combination of two synchronized wavelengths 808 and 905 nm improved functional recovery after SCI evaluated by battery of locomotor tests and somatosensory plantar test. The group treated by photobiomodulation obtain better results in all tests. The histopathological analysis showed a positive effect on white and gray matter sparing and our data suggests an upregulation of M2 microglia/macrophages in photobiomodulation treated rats assessed by immunohistochemical and RT-qPCR analysis. Our results demonstrated that the photobiomodulation is a promising non-invasive therapy for improving functional recovery and tissue sparing after SCI.

EGCG and curcumin are natural compounds known in Chinese medicine for centuries. Their neuroprotective and immunomodulatory effect was investigated in second part of the thesis. Both compounds influenced the immune response and tissue regeneration through changes in cytokine levels and glial scar formation after severe SCI. We did not observe the synergistic response of combination EGCG and curcumin. The synthetic nanocurcumin offers a new delivery system of curcumin with higher biological availability. We found significant changes in the locomotor patterns of the hindlimbs, histology and immunohistochemistry revealed protection of the white matter and reduction of the glial scar. It also has immunomodulatory properties which ameliorate the local immune response in the early stage of the SCI.

Our data suggests the potential of all investigated therapies to mitigate the impact of SCI.

Key words: spinal cord injury, photobiomodulation, EGCG, curcumin, neuroregeneration

Publikace autora

Publikace relevantní k dizertační práci:

Svobodova, B.; Kloudova, A.; Ruzicka, J.; Kajtmanova, L.; Navratil, L.; Sedlacek, R.; Suchy, T.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P.; Machova Urdzikova, L. The effect of 808 nm and 905 nm wavelength light on recovery after spinal cord injury. *Sci Rep.* 2019 May 21;9(1):7660.

Podíl studenta: *behaviorální testování, mikroskopická analýza, analýza genové exprese, vyhodnocení a zpracování dat, statistická analýza, psaní článku*

Machova Urdzikova, L.; Ruzicka, J.; Karova, K.; Kloudova, A.; **Svobodova, B.**; Amin, A.; Dubisova, J.; Schmidt, M.; Kubinova, S.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P. A green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances neuroregeneration after spinal cord injury by altering levels of inflammatory cytokines. *Neuropharmacology.* 2017 Nov;126:213-223.

Podíl studenta: *behaviorální testování, vyhodnocení a zpracování dat*

Ruzicka, J.; Urdzikova, L.M.; **Svobodova, B.**; Amin, A.G.; Karova, K.; Dubisova, J.; Zavislova, K.; Kubinova, S.; Schmidt, M.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P. Does combined therapy of curcumin and epigallocatechin gallate have a synergistic neuroprotective effect against spinal cord injury? *Neural Regen Res.* 2018 Jan;13(1):119-127.

Podíl studenta: *behaviorální testování, PCR analýza, mikroskopie*

Krupa, P.; Svobodova, B.; Dubisova, J.; Kubinova, S.; Jendelova, P.; Urdzikova, L.M. Nano-formulated Curcumin (Lipodisq(TM)) modulates the local inflammatory response, reduces glial scar and preserves the white matter after spinal cord injury in rats. *Neuropharmacology.* 2019 May 17.

Podíl studenta: *behaviorální testování a vyhodnocování dat*

Ostatní publikace:

Hejcl, A.; Ruzicka, J.; Kekulova, K.; **Svobodova, B.**; Proks, V.; Mackova, H.; Jirankova, K.; Karova, K.; Machova Urdzikova, L.; Kubinova, S.; Cihlar, J.; Horak, D.; Jendelova, P. Modified Methacrylate Hydrogels Improve Tissue Repair after Spinal Cord Injury. Int J Mol Sci. 2018 Aug 22;19(9).

Seznam zkratek

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , analýza rozptylu
Arg1	Argináza 1
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adenosin trifosfát
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , mozkový neurotrofní faktor
Ca ²⁺	Vápníkové ionty
Casp3	<i>Caspase 3</i> , kaspáza 3
CCO	Cytochrom c oxidáza
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , diferenciační skupina
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	Centrální nervový systém
Cntf	Ciliární neurotrofický faktor
ECM	Extracelulární matrix
EGCG	Epigallocatechin-3-gallát
FBM	Fotobiomodulace
Fgf2	<i>Fibroblast growth factor 2</i> , fibroblastový růstový faktor 2
Gap43	<i>Growth Associated Protein 43</i> , s růstem asociovaný protein 43
Gapdh	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> , neurotrofický faktor z gliální linie
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , gliální fibrilární acidický protein
HKK	Hřeben kosti kyčelní
IFN γ	Interferon γ
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor 1</i> , insulínu-podobný růstový faktor-1
IL	Interleukin
Irf5	Interferon regulující faktor 5
K ⁺	Draselné ionty
LEDs	<i>Light-emitting diodes</i> , světlo emitující diody
MP	Míšní poranění
Mrc1	Manózoový receptor C typu 1

Na ⁺	Sodné ionty
NFκB	Nukleární faktor kappa B
NGF	<i>Nerve growth factor</i> , nervový růstový faktor
NO	Oxid dusnatý
Olig2	Oligodendrocytární transkripční faktor 2
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ribonukleová kyselina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , střední chyba průměru
Sort1	Sortilin 1
TNFα	<i>Tumor necrosis factor</i> , faktor nádorové nekrózy α
Vegf	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , vaskulární endotelový růstový faktor

Obsah

1	ÚVOD.....	14
1.1	Centrální nervový systém.....	14
1.2	Mícha.....	15
1.3	Patologie míšního poranění	17
1.3.1	Akutní poranění.....	18
1.3.2	Subakutní fáze	21
1.3.3	Intermediální fáze a chronická fáze	23
1.4	Experimentální modely poškození	24
1.5	Léčby	27
1.5.1	Fotobiomodulace	29
1.6	Přírodní látky ovlivňující sekundární poškození.....	31
1.6.1	Epigallocatechin-3-gallát.....	31
1.6.2	Kurkumin	32
2	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	35
2.1	Hypotézy	35
2.1.1	Cíle.....	35
3	MATERIÁL A METODIKA PRÁCE.....	36
3.1	Pokusná zvířata a etické prohlášení.....	36
3.2	Míšní poranění	36
3.3	Experimentální léčba.....	36
3.3.1	Ozařování laserovým světlem	36
3.3.2	EGCG.....	37
3.3.3	EGCG a kurkumin.....	37
3.3.4	Nanokurkumin.....	37
3.4	Behaviorální testování	38
3.4.1	BBB test	38

3.4.2	Plantar test	38
3.4.3	Chůze po tyči	38
3.4.4	Kvantifikace lokomoce	39
3.5	Zpracování tkáně.....	39
3.6	Histologická analýza	40
3.7	Imunohistochemická analýza	40
3.8	qRT-PCR.....	41
3.9	Analýza cytokinů	42
3.10	Statistická analýza	42
4	VÝSLEDKY.....	44
4.1	Vliv laserového světla o vlnové délce 808 a 905 nm na regeneraci po MP	44
4.1.1	Motorika a senzitivita zadních končetin.....	44
4.1.2	Zachování šedé a bílé hmoty míšni	47
4.1.3	Gliová jizva.....	48
4.1.4	Růst axonálních kolaterál	50
4.1.5	Analýza mikroglíí/makrofágů	51
4.1.6	qRT-PCR	52
4.2	Vliv polyfenolu ze zeleného čaje EGCG a kurkuminu na regeneraci po MP	53
4.2.1	Aktivita dráhy NFκB.....	53
4.2.2	Hladiny cytokinů.....	54
4.2.3	Motorika a senzitivita zadních končetin.....	55
4.2.4	Histologická a imunohistochemická analýza 9 týdnů po MP	57
4.2.5	qPCR	60
4.3	Vliv nanokurkuminu na regeneraci po MP.....	61
4.3.1	Motorika a senzitivita zadních končetin.....	61
4.3.2	Histologická a imunohistochemická analýza 9 týdnů po MP	62
4.3.3	qPCR	64

5	DISKUSE	65
5.1	Vliv laserového světla o vlnové délce 808 a 905 nm na regeneraci po MP	65
5.2	Vliv EGCG, kurkuminu, jejich kombinace a nanokurkuminu na regeneraci po MP ..	69
6	ZÁVĚR	74
7	SOUHRN.....	76
8	SUMMARY	77
9	LITERATURA.....	78

1 ÚVOD

1.1 Centrální nervový systém

Nervový systém lidského těla se skládá ze dvou částí, centrálního a periferního nervového systému. K centrálnímu nervovému systému (CNS) patří mozek a mícha. Hlavními buňkami tvořící tkáň CNS a přenášející informace jsou neurony. Jsou základní strukturní i funkční jednotkou. Jejich velikost a tvar se liší dle typu a funkce a pohybuje se od 5 μm (interneurony) po více než 100 μm (motoneurony). Buňka neuronu se skládá z buněčného těla, dendritů a jednoho či více axonů. Dendrity přijímají a integrují příchozí informace, axony šíří informace na další buňky přes specializované mezibuněčné spoje zvané synapse.

Dalšími buňkami CNS jsou neuroglie, které lze dělit na makroglie vzniklé při vývoji z neurální trubice a mikroglie, které jsou mezoderálního původu. K makroglím se řadí astrocyty a oligodendrocyty. Astrocyty jsou velké buňky hvězdicovitého tvaru s četnými výběžky a mnoha různými funkcemi. Jejich výběžky nasedají na stěny krevních kapilár v mozku a přebírají z krve potřebné živiny pro neurony. Další výběžky nasedají na neurony a jejich synaptická spojení a komunikují s nimi pomocí gliotransmiterů. Astrocyty se rovněž podílí na udržování extracelulární iontové rovnováže a hrají významnou úlohu při poškození nervové tkáně.

Oligodendrocyty vytváří myelinová pouzdra, která izolují axony. Jeden oligodendrocyt může obalovat několik axonů. V periferním nervovém systému plní tuto úlohu Schwannovy buňky, ty však obalují vždy pouze jeden axon. Tyto buňky jsou důležité pro urychlení přenosu informací a pro zabránění přeskokování elektrického vzruchu mezi jednotlivými vlákny.

Mikroglie jsou imunitními buňkami CNS. Za fyziologických podmínek v klidovém stavu mají malé jádro a jsou bohatě rozvětvené. Jejich výběžky se neustále pohybují po okolí a monitorují prostředí. V případě poranění jsou velmi rychle aktivovány a migrují do místa poranění, mění svou morfologii, jsou schopny fagocytózy a sekretují signální molekuly.

1.2 Mícha

Mícha je dlouhá nervová trubice procházející míšním kanálem. Přijímá informace z těla prostřednictvím sensorických neuronů a přenáší tyto informace do mozku. Tok informací rovněž proudí z mozku přes míchu a její motoneurony do celého těla a zprostředkovává tak pohyb. Mícha je rozdělena na 31 segmentů, které se sdružují do oblastí – krční, hrudní, bederní, křížové a kostrční. Z každého segmentu míchy vychází skrz míšní rohy nervové kořeny, které se spojují do míšních nervů, každý nerv je tvořen jednotlivými axony.

Mícha je uložena v míšním kanále uvnitř kostěné páteře (Obrázek 1). Páteř se skládá z jednotlivých kostěných obratlů. Každý obratel je od následujícího oddělen fibrózní pojivovou tkání zvanou meziobratlová ploténka. Mícha měří přibližně 40-50 cm. V oblasti bederních a křížových nervů se zakončení míchy nazývá *cauda equina* neboli koňský ohon. Z něj vychází nervové svazky sakrálního segmentu nazývané *conus medullaris*, které končí na úrovni druhého bederního obratle.

Mícha se skládá z vnitřní šedé hmoty, která obsahuje těla neuronů. Šedá hmota má na příčném řezu tvar motýla a obklopuje ji bílá hmota, která obsahuje axony vedoucí informace mezi jednotlivými úseky míchy nebo axony zprostředkovávající tok informací mezi míchou a mozkem. Neurony dorzální části šedé hmoty přenášejí sensorické a senzitivní informace a neurony ventrální poloviny šedé hmoty zprostředkovávají přenos motorických funkcí a jsou mezi nimi motoneurony, jejichž axony prochází přímo ke svalům a vytváří s nimi kontakty.

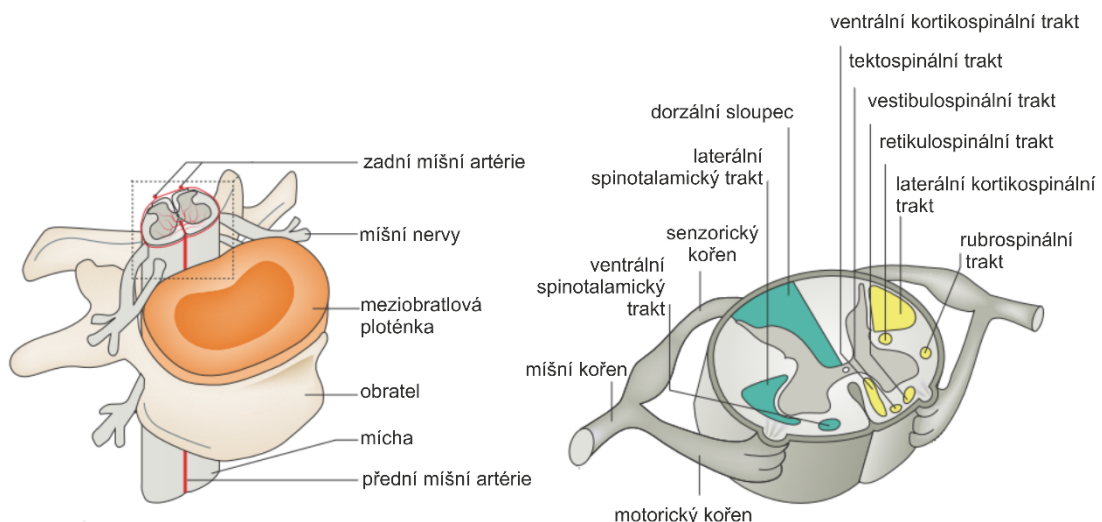
Z míchy vystupují dva typy nervových kořenů, dorzální kořen je tvořen sensorickými axony a ventrální je tvořen motorickými axony. Těla neuronů, jejichž axony vedou dorzálním kořenem, jsou uložena v dorzálních míšních ganglionech, které se nachází také v páteři, avšak mimo míchu. Axony motoneuronů opouští míchu přes ventrální rohy a pokračují do svalů. Elektrický impulz putuje na konec motorického axonu až ke svalové buňce, kde vytváří velké a komplexní synapse nazývané nervosvalové ploténky. Zde je axony uvolňován neuropřenašeč acetylcholin, který způsobí elektrickou excitaci svalových buněk a jejich kontrakci, což vyvolá pohyb. Sensorická nervová zakončení ve svaly monitorují stupeň protažení a vysílají elektrické

signály motoneuronům v míše a informují je o protažení svalu. Tato senzorká zpětná vazba je nezbytná pro správné fungování svalů a pro vznik reflexů.

Senzorické axony aktivující motorické neurony vytváří větve, které míří do mozkového kmene cestou dorzální bílé hmoty míšni. Poskytují mozku informace o svalové kontrakci. Nervové buňky v mozku vysílají axony do míchy a dávají přes motorické neurony pokyn k zahájení pohybu. Největší z těchto sestupných drah z mozku se nazývá kortikospinální trakt a je součástí motorického systému. Axony kortikospinálního traktu se kříží na úrovni prodloužené míchy, takže levá strana mozku ovládá pravou stranu těla a naopak.

Senzorické funkce jsou z těla do mozku vedeny dvěma hlavními cestami. První jsou velké myelinizované axony nesoucí informaci o lehkém doteku, pozici kloubů a vibracích. Tyto vlákna stoupají v dorzálních provazcích na stejné straně těla, ze které pocházejí. Tyto vlákna nesou informaci sloužící mozku k interpretaci informací s vysokou přesností a rozlišením.

Druhou cestou vedení senzorky jsou menší axony vedoucí široké spektrum senzorkých modalit zahrnující bolest a teplotu, které ale nejdou cestou přímých provazců do mozku. Tyto axony vytváří synapse se sekundárními senzorkými axony uloženými v zadní části šedé hmoty (v dorzálních rozích). Tyto sekundární neurony pak posílají jejich axony na druhou polovinu míchy do anterolaterálního sloupce.



Obrázek 1. Stavba páteře a míchy. Upraveno z (Ahuja et al., 2017).

1.3 Patologie míšního poranění

Míšní poranění (MP) vede k poškození vedení vzruchů míchou, čímž je ovlivněna nejen hybnost, ale i další tělesné systémy. Poranění má vliv na spoustu aktivit běžného denního života. V České republice je incidence MP mezi 250 a 300 jedinci ročně, což je přibližně 16,6 případů na 1 milion obyvatel za rok. Z větší části se jedná o muže, průměrný věk pacientů je 49 let (JEP, 2018).

MP je komplexní série lokálních a systémových sekundárních odpovědí na počáteční primární poranění. Sekundární fáze těchto patofyziologických procesů zhoršuje počáteční poškození, což brání endogennímu uzdravování a snaze o regeneraci. MP je velmi heterogenní, každý pacient je jedinečný z důvodu různých příčin poškození, jiné architektury léze a následků. To dělá léčbu nesnadnou a výzkum vyžaduje rozmanitou škálu zvířecích modelů MP. V současné době neexistuje žádná efektivní terapie. Vývoj úspěšné léčby musí být založen na hlubším porozumění patofyziologie MP a pochopení jednotlivých atributů přispívajících k progresi MP.

Mícha je za fyziologických okolností chráněna před poškozením kostěnými obratli. Traumatické síly, jako jsou dopravní nehody, skoky do mělké vody, nebo zranění při sportu, mohou způsobit poranění páteře vedoucí ke vzniku MP. Většina případů vzniká tímto tupým poraněním míchy. Avšak existují i případy penetrujícího traumatu vlivem bodného nebo střelného zranění (Burney et al., 1993). Neúrazové příčiny mohou být cévního původu, při zánětlivých a nádorových onemocněních.

Mícha je málokdy během zranění úplně přerušena a to i v případech velmi vážných neurologických poruch (Sekhon and Fehlings, 2001). Během primárního poškození na ni působí střížné a tažné síly, častěji se však jedná o kontuzi a kompresi. V nízkém procentu případů dochází k laceraci následkem násilného vniknutí cizího předmětu nebo fragmentem obratle (Tator, 1995).

Studie na potkanech prokázaly zvyšující se neurologické poškození v závislosti na síle traumatu a času komprese (Nystrom and Berglund, 1988). Buňky, především neurony a jejich axony, se stávají permeabilizovanými ihned po poranění kvůli kompresním a střížným silám (LaPlaca et al., 2007; Choo et al., 2007), což vede k okamžité buněčné smrti. Fyzické poškození tkáně rovněž vede k poškození lokálního cévního řečiště, což vyvolá vznik edému a hemoragie především v dobře prokrvené šedé

hmotě. Akutní neuroanatomické následky poškození v důsledku porušení funkcí a smrti neuronu a dalších buněčných typů mají vliv na motorické, senzorycké a autonomní funkce v úrovni poškozené míchy. Navíc axonální poškození vede k poruše komunikace v aferentních i eferentních drahách bílé hmoty.

Síly, závažnost a lokace primárního inzultu rozhoduje o povaze sekundárních dějů, které mají podíl na rozsahu tkáňového a funkčního poškození. Počáteční trauma zasahuje řadu systémových, buněčných a molekulárních kaskád, které rozšiřují objem zasažené tkáně a přispívají k dalšímu odumírání buněk. Na druhou stranu existují endogenní procesy, které se snaží omezit šíření léze a pokouší se tkáň regenerovat a znovu spojit poškozené signální dráhy.

U lidí a potkanů dochází v místě léze ke vzniku cystické kavity vyplněné tekutinou, která se časem rozšiřuje z epicentra radiálně i rostrokaudálně. Do místa léze se infiltrují makrofágy, lymfocyty a dochází k demyelinizaci a aktivaci mikroglie v místě léze (Nashmi and Fehlings, 2001). Astrocyty proliferují a obklopují kavitu ve snaze zabránit dalšímu šíření poškození a vytváří gliovou jizvu (Faulkner et al., 2004). Tato gliová jizva však rovněž vytváří fyzickou i chemickou bariéru pro axonální regeneraci. Fibrózní jizva je tvořena kolagenem a škálou inhibičních molekul extracelulární matrix (ECM). Dochází k Wallerově degeneraci poškozených axonů (Ehlers, 2004), které se rozpadají a jsou fagocytovány makrofágy.

1.3.1 Akutní poranění

Po primárním fyzikálním poškození tkáně a smrti neuronů začíná sekundární poškození. Akutní fáze (Obrázek 2) 24 až 48 hodin po poranění je charakteristická ischemií, energetickou a iontovou dysbalancí, excitotoxicitou a brzkými zánětlivými reakcemi, které vedou k nekróze a později apoptóze buněk. Dále jsou v této fázi aktivovány mikroglie produkty vzniklými při nekróze a ty dále sekretují zánětlivé cytokiny, které do místa léze přitahují systémové zánětlivé buňky.

Vazokonstrikce a narušená autoregulace spolu s hemoragií a poruchou mikrocirkulace v místě poranění přispívá k celkové ischemické patologii. Po poranění je porušena schopnost regulovat lokální tlak krve v míše, což vede k sníženému průtoku krve, čemuž přispívá i celková systémová hypotenze (Guha et al., 1989; Guha and Tator,

1988). Vazokonstrikce může být způsobena samotným poškozením nebo uvolněnými vazoaktivními faktory jako je histamin nebo oxid dusnatý (NO) (Anthes et al., 1996).

Dysfunkce v metabolické homeostáze sodných (Na^+), draselných (K^+) a vápenatých (Ca^{2+}) iontů spolu s glutamátem poškozuje správné fungování buněk a navozuje buněčnou smrt. MP vede k zvýšení intracelulární koncentrace Na^+ a Ca^{2+} v axonech kvůli selhávání iontových pump, inaktivaci iontových kanálů, reverznímu chodu iontových výměníků a membránové depolarizaci (Stys and Lopachin, 1998; Agrawal and Fehlings, 1996). Intracelulární zvýšení iontů Ca^{2+} v astrocytech a oligodendrocytech a nadměrná glutamátová signalizace mohou hrát roli v poškození bílé hmoty (Li and Stys, 2000). Poškození zpětného vstřebávání glutamátu astrocyty je z důvodu poškozené funkce glutamátových transportérů, buněčné smrti a uvolňování glutamátu neurony, axony a gliemi přes reverzní Na^+ -dependentní glutamátové transportéry. Všechny tyto pochody vedou ke zvýšení intracelulární koncentrace glutamátu (Li et al., 1999). Toto zvýšení je pozorováno v prvních 3 hodinách po MP a vede ke změnám ve funkcích glií a axonů a k buněčné smrti neuronů šedé hmoty (McAdoo et al., 1999; Liu et al., 1999).

Změny v akutním energetickém metabolismu po MP jsou charakteristické nedostatkem adenosin trifostátu (ATP), počátečním poklesem koncentrace glukózy a nárůstem poměru laktát/pyruvát (Anderson et al., 1980; Braugher and Hall, 1984). Výsledný deficit v energetickém metabolismu je způsoben sníženým prokrvením tkáně a nedostupností glukózy pro buňky.

Nadbytek vápníkových iontů v buňce má za následek neuronální buněčnou smrt a axonální degeneraci způsobenou aktivací proteinových kináz a proteáz a mitochondriální dysfunkcí. Některé proteázy jsou aktivovány ihned po MP právě díky zvýšené koncentraci Ca^{2+} iontů a vedou k degradaci cytoskeletálních proteinů, jako jsou neurofilamenta a mikrotubuly, čímž narušují axonální integritu a funkci (Banik et al., 1997).

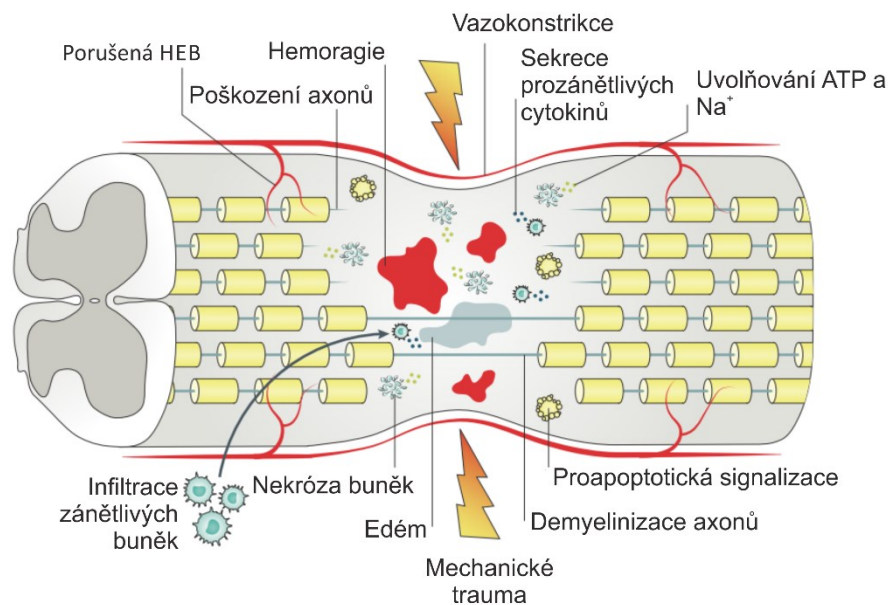
Vysoké hodnoty intracelulárního vápníku rovněž narušují správné fungování mitochondrií, které následně produkují zvýšené množství reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) v neuronech a gliových buňkách (Hall, 1989; Lewen et al., 2000). Maximum produkce ROS bylo experimentálně stanoveno na 12 hodin po MP a

zvýšená hladina ROS přetrvává 4 až 5 týdnů (Donnelly and Popovich, 2008). Kromě nekrotické buněčné smrti mohou buňky vystavené oxidačnímu stresu přecházet do buněčné smrti apoptózou (Mronga et al., 2004; Bao and Liu, 2003). Součástí mitochondriemi produkovaných ROS je superoxid (O_2^-) a peroxid vodíku (H_2O_2). Pokud superoxid není neutralizován, O_2^- může reagovat s NO, čímž dojde ke vzniku peroxynitritu (-ONOO), jednoho z nejvíce aktivních a škodlivých volných radikálů. Pokud produkce ROS přesáhne antioxidantní kapacitu buněk, jako je tomu v případě mitochondriální dysfunkce, tyto reaktivní molekuly mohou poškodit proteiny, DNA a lipidy. Zdrojem ROS po poškození nervové tkáně mohou být i infiltrované neutrofily (Carlson et al., 1998).

Po MP se spouští zánětlivá odpověď, což je komplexní interakce místních a systémových mediátorů. Zánětlivý proces přispívá k sekundárnímu poškození, ale zároveň je důležitý pro obnovu tkáně například díky odstraňování zbytků buněčných těl. Během několika hodin po MP jsou aktivovány mikroglie, pro něž je signálem poranění cév, ztráta tkáňové homeostázy a produkty nekrózy (ATP, DNA, extracelulární draselné ionty). Mikroglie mění svou morfologii z rozvětvené do améboidní a uvolňují do okolí cytokiny jako faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α , TNF α), interferon λ (IFN λ), interleukin (IL)6, IL1 β a NO. Tyto cytokiny přitahují systémové zánětlivé buňky a modulují proteinovou expresi v neuronech a gliích. Výsledkem je neurotoxicita a poškození myelinu (Carlson et al., 1998; Popovich et al., 1997; Hausmann, 2003; Fleming et al., 2006). První systémové zánětlivé buňky, které se infiltrují do místa poškození během prvních několika hodin, jsou neutrofily. Tento buněčný typ je v místě léze v maximální koncentraci první dva dny (Donnelly and Popovich, 2008; Carlson et al., 1998; Fleming et al., 2006). Neutrofily uvolňují melatoproteinázy a myeloperoxidázy, které jsou zdrojem ROS, což může vést k peroxidaci lipidů.

Dalším důsledkem MP je poškození hematoencefalické bariéry, které přetrvává dlouhou dobu po primárním mechanickém poškození lokálního cévního řečiště kvůli vlivu zánětlivých mediátorů na endoteliální buňky a umírání astrocytů. Studie na potkanech ukázaly nejvyšší permeabilitu 24 hodin po MP s přetrváním poškození dva týdny (Noble and Wrathall, 1989). Zánětlivé cytokiny IL1 β a TNF α jsou zodpovědné za

akutní nárůst cévní permeability (Schnell et al., 1999). Nárůst exprese ROS, NO, histaminu a metaloproteináz přispívá k prodloužení doby permeability.



Obrázek 2. Děje v akutní fázi. Upraveno z (Ahuja et al., 2017).

1.3.2 Subakutní fáze

Subakutní fáze (Obrázek 3) trvá přibližně od 2 dnů do 2 týdnů. Tato fáze je charakteristická masivní infiltrací imunitních buněk, reaktivní astrogliózou, remodelováním ECM, dalším odumíráním buněk a pokračující axonální demyelinizací a degenerací. Z reparačních endogenních reakcí organismu dochází k proliferaci endogenních progenitorových buněk, odstraňování buněčných zbytků, angiogenezi a ohraničení místa poškození astrocytární jizvou.

Do místa léze doputují monocyty 2 až 3 dny po primárním poškození a zůstávají přítomny a aktivovány několik týdnů (Popovich et al., 1997; Sroga et al., 2003; Blight, 1992). Aktivací vznikají z monocytů makrofágy, které jsou morfoloicky nerozlišitelné od rezidentních mikroglíí, sdílí s nimi i podobný profil exprese cytokinů. Makrofágy se stávají chronicky přítomnými buněčnými elementy vyskytujícími se v míše po poranění u potkanů i lidí. Přítomnost těchto typů buněk má přínosný i škodlivý efekt, avšak všechny jejich role nejsou příliš objasněny (Kigerl et al., 2009; Popovich et al., 1999; Shechter et al., 2009).

Reakce makrofágů (včetně těch vzniklých z mikroglíí) v místě poranění jsou velmi heterogenní. Jedna skupina makrofágů podporuje spíše degeneraci (M1), druhá přispívá

k regeneraci (M2) (Kigerl et al., 2009). Avšak toto rozdělení není jednoznačné a spíše existuje celá škála buněčných typů než rozdělené skupiny (Hawthorne and Popovich, 2011). Transplantace makrofágů s M2 fenotypem nebo manipulace endogenními makrofágy do M2 fenotypu zmírňuje patologii, podporuje regeneraci a napomáhá funkčnímu zlepšení po MP u potkanů (Guerrero et al., 2012; Rapalino et al., 1998; Nakajima et al., 2012; Miron et al., 2013).

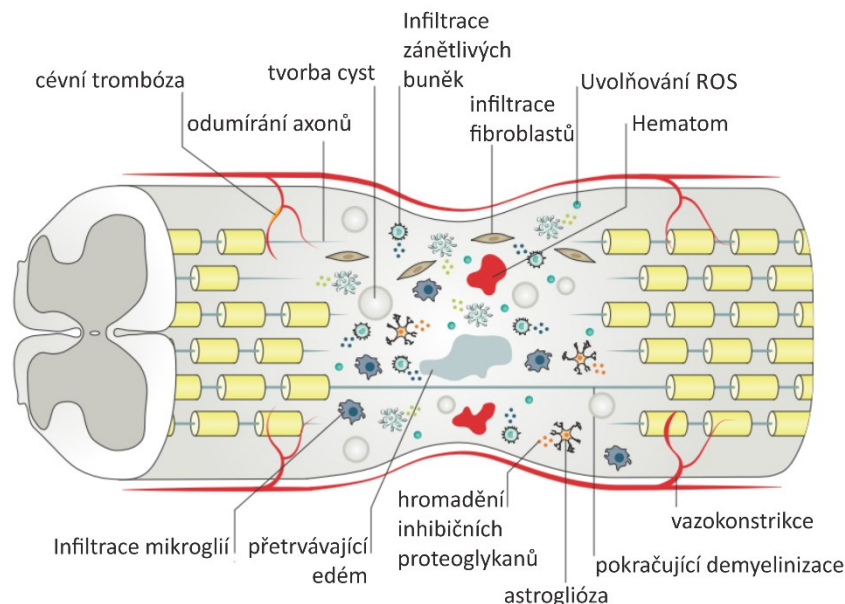
T-lymfocyty vstupují do míchy mezi 3. a 7. dnem po MP v odpovědi na cytokinové/chemokinové signály z aktivovaných mikroglíí a makrofágů (Donnelly and Popovich, 2008; Fleming et al., 2006). T-lymfocyty mohou regulovat makrofágovou/mikroglialní aktivitu především kontrolovanou sekrecí prozánětlivých či protizánětlivých cytokinů. Díky cytokinové signalizaci, CNS-specifické T-buňky lákají antigen-nezávislé T buňky do místa poškození a tyto buňky sekretují škálu trofických faktorů jako jsou insulinu-podobný růstový faktor-1 (insuline-like growth factor 1, IGF-1) a mozkový neurotrofický faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) (Moalem et al., 2000; Schwartz et al., 1999).

Několik extracelulárních a intracelulárních podnětů, zahrnujících nedostatek růstových faktorů, zvýšení zánětlivých mediátorů, aktivace receptorů buněčné smrti a poškození DNA, mohou způsobit apoptózu buněk v subakutní fázi (Ellis et al., 1991). K apoptotické smrti jsou náchylné neurony a ještě více oligodendrocyty (Casha et al., 2001; Grossman et al., 2001). V apoptotické signalizační dráze hrají významnou roli mitochondrie. Několik proapoptotických proteinů, jako je cytochrom c a apoptózu indukující faktor, může být za určitých okolností uvolněno do mitochondriálního mezimembránového prostoru. Ca^{2+} ionty vnikají do přežívajících gliových buněk. Tento jev se v průběhu času rozšiřuje od místa epicentra (Mills et al., 2004). Zvýšení intracelulárních koncentrací Ca^{2+} iontů vyústí v jejich akumulaci v mitochondriích, což způsobí zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány, což přispívá k uvolňování proapoptotických proteinů do cytoplasmy (Ankarcrona et al., 1995).

Dalším dějem subakutní fáze je tvorba gliové jizvy. Astrocyty, které přežijí primární a akutní sekundární fázi poranění odpovídají na MP aktivací/proliferací a obklopením vznikající cystické kavity, aby zabránily jejímu dalšímu šíření. Tento proces je typicky nazýván astroglióza nebo vznik gliální jizvy, během kterého astrocyty vytvářejí

hustou sítí. Navzdory prospěšné roli ve snaze limitovat rozšíření léze, fyzická přítomnost astrocytů představuje bariéru pro axonální regeneraci. Astrocyty také exprimují a sekretují chondroitin sulfát proteoglykany a další inhibiční molekuly, které mohou narušovat pučící axonální růstové výběžky neuronů (Buss et al., 2007; Jones et al., 2003). Reaktivní astrocyty jsou typicky charakterizované zvýšeným množstvím kyselého gliálního fibrilárního proteinu (glial fibrillar acidic protein, GFAP).

Vnitřní a hraniční část léze se nazývá fibrózní jizva. V ní obsažená ECM prochází velkými změnami jako důsledek poškození díky aktivaci gliálních a imunitních buněk, infiltraci fibroblasty a odstraňování nekrotických zbytků buněk a myelinu. Hyaluronanové sloučeniny za normálních okolností přítomné v ECM jsou po MP degradovány hyaluronidázou a ROS (Noble, 2002).



Obrázek 3. Subakutní fáze po MP. Upraveno z (Ahuja et al., 2017).

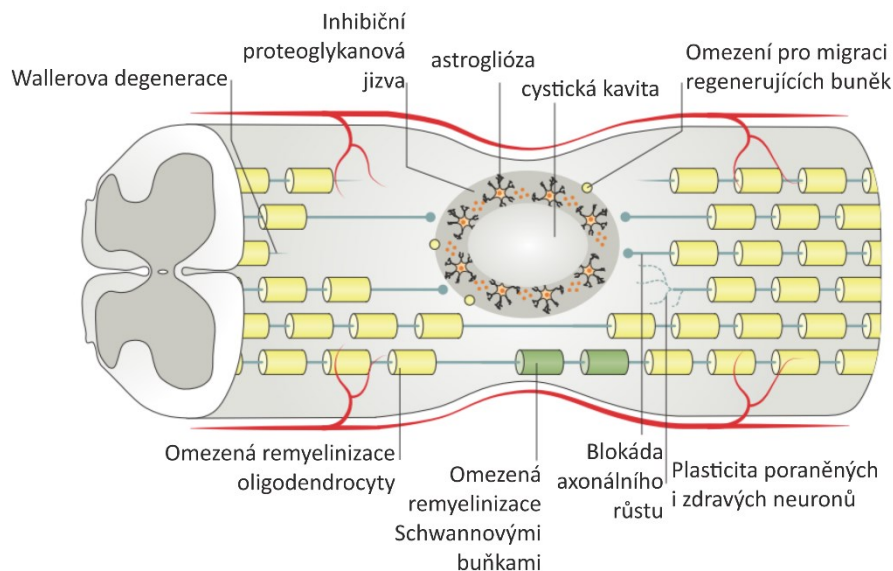
1.3.3 Intermediální fáze a chronická fáze

Tato fáze je od 2 týdnů do 6 měsíců po MP (Obrázek 4). Dále se vyvíjí gliální a fibrotická jizva, v místě poranění jsou i nadále přítomny aktivní makrofágy, pokračuje degenerace axonů v částech na okraji léze. Části poškozených axonů distálně do buněčného těla degenerují (Wallerova degenerace) a dochází k rozpadu myelinu. Jejich zbytky fagocytují makrofágy. Dále díky plasticitě dochází ke vzniku nových axonálních kolaterál (axonal sprouting) a endogenní remyelinizaci. Oligodendrocytární prekurzorové buňky se podílí na remyelinizaci poškozených axonů (Horner et al., 2000).

U potkanů byly zdokumentovány regenerující axonální výběžky v kortikospinálním a retikulospinálním traktu (Hill et al., 2001). Axonální regenerace přes místo poškození je ale limitovaná vytvořenými fyzickými bariérami spolu s vlivem inhibičních molekul a nedostatečným množstvím stimulačních růstových faktorů (Silver et al., 2014).

Přesto, že vznik nových axonálních kolaterál může vést ke zlepšení funkcí, může rovněž docházet ke vzniku aberentních spojení, která vedou k patologickým jevům jako je bolest, autonomní dysreflexie nebo vznik křečí (Romero et al., 2000; Weaver et al., 2006).

Za chronickou fází je považováno období od 6. měsíce po MP. Pokračuje Wallerova degenerace poškozených axonů směrem k buněčnému tělu a začíná se rozvíjet neuropatická bolest. Cystická kavita je vyplněna kolagenními vlákny, astrocyty a drobnými cévkami. Po 1 až 2 letech je stav považován za stabilní.



Obrázek 4. Intermediální a chronická fáze po MP. Upraveno z (Ahuja et al., 2017).

1.4 Experimentální modely poškození

Díky heterogenní povaze poranění míchy je zapotřebí různorodá škála zvířecích experimentálních modelů tak, aby co nejvěrněji napodobovala různé typy poškození míchy. Pro úspěšné nalezení terapie je potřeba objasnit mechanismus a progresi poranění. Existující zvířecí modely využívající kontuzní přístroje, metody komprese míchy pomocí pinzet a aneurysmatických svorek, balónkovou kompresní lézi a transekční poranění poloviny nebo celé míchy. Experimenty jsou prováděny především na myších, potkanech a dalších savcích.

Experimentální zvířecí modely slouží k pochopení fyziologických a patofyziologických dějů navazujících na MP a pro sledování následné regenerace, dále k testování bezpečnosti a účinnosti potenciálních terapií. Zvířecí modely zkoumají děje po MP za definovaných podmínek. Při výběru konkrétního experimentálního modelu je vždy nutné pohlížet na jejich relevantnost a na vhodné hodnocení výsledků pozorování.

Nejstudovanější částí míchy je hrudní oblast (cca 80 % vědeckých prací), následně oblast krční. Základní mechanismy poškození lze rozdělit na mechanické (95 %) a nemechanické (5 %). K mechanickým poškozením patří nejčastěji kontuze, transekce a komprese, nemechanická jsou poškození ischemická, excitotoxická, fotochemická a elektrolytická. Nejvíce využívaná zvířata jako modely MP jsou potkani (72 %) a myši. Hodnocené parametry mohou být klasifikovány do 7 kategorií zahrnující biologické, behaviorální, neurofyziologické, zobrazovací, nervosvalové, kardiovaskulární a respirační testy (Sharif-Alhoseini et al., 2017).

Většinu typů MP vyskytujících se u lidí je možné modelovat u dospělých potkanů. To zahrnuje úplné i neúplné poškození na různých úrovních míchy. Úplné poranění v nižších částech hrudní míchy vede k trvalé paralýze zadních končetin a příslušnému porušení sensorického a autonomního systému (Kjell and Olson, 2016). Přesnou lézi lze vytvořit za použití nože nebo nůžek a lze tak modelovat některé typy poškození míchy u lidí, jako například bodné poranění nožem. Tyto přesné transekční modely poskytují výhodu možnosti přerušení konkrétních struktur a traktů a sledování následné axonální regenerace.

Většina MP u lidí je však typicky způsobena pády nebo dalšími formami fyzického úrazu, které naruší páteř a komprimují míchu. Typický model MP u potkanů zahrnuje laminektomii, čímž dojde k odhalení míchy, s následným provedením komprese nebo kontuze (Rosenzweig and McDonald, 2004).

Kompresní modely poranění jsou obvykle provedeny s použitím svorky nebo pinzety. Další možností je využití balónkové kompresní léze (Vanicky et al., 2001), při které je laminektomie provedena o několik obratlů níže, než je místo vzniku léze způsobené nafouknutím balónku, což lépe napodobuje reálnou situaci při MP. Prodlužování doby komprese zhoršuje následky MP, bylo prokázáno, že dekomprese snižuje následky sekundárního poškození a zlepšuje uzdravování (Carlson et al., 1997;

Dimar et al., 1999; Dolan et al., 1980). Výzkum lidských pacientů podporuje především neuroprotektivní efekt dekompresí (Fehlings and Perrin, 2005). Dekomprese je v současnosti jedinou používanou terapií u lidí a je aplikovatelná pouze u některých forem MP. Kompresní model je díky své podobnosti s lidským traumatickým MP vhodné použít pro translační výzkum. V chronické fázi dochází ke vzniku podobné gliové jizvy jako u lidských pacientů (Cregg et al., 2014). Je to model vhodný pro sledování vlivu různých terapeutických přístupů a lze na něm studovat mechanismy sekundárního poranění (Sun et al., 2017).

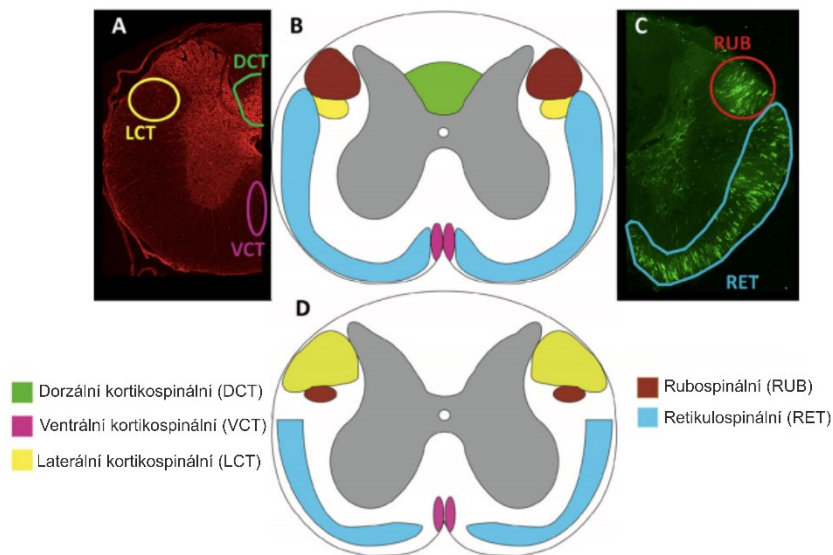
Kontuzní poranění je výsledkem prudkého úderu na míchu a bývalo modelováno pomocí tzv. „weight drop“ zařízení (Gruner, 1992), které je řízeno počítačem a poskytuje i informaci o síle způsobující MP (Sharif-Alhoseini et al., 2017). Nejčastěji jsou používány impaktory, které na míchu spouští závaží z definované výšky (Gruner, 1992). Kontuzní model simuluje poškození míchy způsobené pádem z výšky. Je rovněž vhodný pro studium sekundárních dějů po MP (Sharif-Alhoseini et al., 2017).

Pro hodnocení výsledků experimentálních terapií po MP hlodavců slouží celá řada metod. Behaviorální testy zkoumají poškození a následnou obnovu neurologických funkcí somatomotorického systému (Muir and Webb, 2000). Tyto testy můžeme dělit na motorické, lokomotorické, senzorické a senzomotorické (Ahmed et al., 2019).

Myši bývají využívány pro možnost genetických úprav a snadnější studium úloh jednotlivých genů a proteinů po MP a při regeneraci. Vyšší savci jsou nezbytní pro ověření, že terapeutické přístupy fungující u hlodavců budou fungovat i u větších zvířat, velikostí a fyziologií podobnějších lidem (Kjell and Olson, 2016). Potkani jsou nejvyužívanější živočišný druh pro výzkum míšního poškození, jejich výhodou je podobná patologie jako v případě poranění lidské míchy. Po MP vznikají cystické kavity kraniálně a kaudálně od místa poranění (Bunge et al., 1993; Bunge et al., 1997; Josephson et al., 2001). U myši tyto kavity nevznikají a buňky v místě poranění proliferují (Ma et al., 2001; Goritz et al., 2011).

Mezi drahami v lidské a potkaní míše však existují anatomické rozdíly (Friedli et al., 2015), na což se musí brát ohled při plánování experimentů. Mohutný kortikospinální trakt potkana vede z velké části dorzální míchou, u lidí je však přítomný pouze v laterální a přední oblasti (Obrázek 5). Lidský kortikospinální trakt je monosynaptický, u potkanů

je veden nepřímě přes interneurony (Lemon and Griffiths, 2005). Rozdíl je rovněž ve funkci tohoto traktu, u lidí je velmi důležitý pro ovládání pohybů horní končetiny, u potkana hraje mnohem menší roli (Darian-Smith, 2009). Tyto rozdíly souvisí s evolucí a přechodem k chůzi po dvou končetinách. Mnohé změny v anatomii i plasticitě po MP se nachází i v dalších motorických drahách (Onodera and Hicks, 2009).



Obrázek 5. Anatomické rozdíly v kortikospinálním traktu potkana (A,B) a člověka (C,D).
Upraveno z (Filipp et al., 2019).

Rozdíl mezi MP u potkana a člověka je též patrný z rozdílné doby trvání jednotlivých fází po poranění. První primární fáze trvá u potkanů pouze několik hodin či dní, u člověka je prodloužena na několik týdnů. Právě tyto rozdíly mohou být důvodem, proč některé terapie MP fungují na potkanech, ale selhávají při použití v klinických studiích.

1.5 Léčby

Porozumění inhibici nervového růstu a jeho stimulaci, komplexu imunologických, zánětlivých a jizvu-tvořících reakcí, které vznikají po poškození CNS, vede k vývoji několika možných farmaceutických terapií pro tyto onemocnění (Silver et al., 2014). Výzkum farmaceutických přístupů cílí především na sekundární fázi MP a snahu zmírnit její následky. Jedná se především o snahu zamezit neuronům v apoptóze, ke které dochází nejmasivněji 3-8 hodin po MP (Liu et al., 1997; Citron et al., 2000). V delším časovém rozsahu 24 hodin postihuje apoptóza rovněž glie a buňky imunitního systému

(Emery et al., 1998). Toto časové okno, ve kterém dochází k odumírání neuronů a gliových buněk, se jeví jako nadějná možnost pro protektivní terapeutický zásah. Bylo postulováno, že cytotoxický efekt je způsoben uvolňováním a unikáním excitačních signálních molekul a dalších potenciálně toxických molekul uvolňovaných zničenými buňkami, což přispívá k buněčné smrti (Faden and Simon, 1988).

Existuje několik metodických přístupů zkoumané léčby MP. Prvním z nich je boj proti sekundárnímu poškození a snaha o záchranu axonů vedoucích místem léze (Nakashima et al., 2008). Druhým je snaha o opravu spinálních obvodů pomocí léků, biomateriálů a buněčných či tkáňových graftů (Abbasi et al., 2010; Kamelska-Sadowska et al., 2019). Dalším je reaktivace zachovaných, ale nepoužívaných drah, které nebyly zasaženy poraněním (Chen and Levi, 2017). Velmi studovaným přístupem je i intenzivní rehabilitace. Moderním přístupem je použití elektronického přemostění k propojení přerušovaných drah nebo implantovatelná elektronická zařízení spojující periferní nervy s CNS. Výzkum se věnuje i vývoji pohyblivých exoskeletů, které mají podpořit pohyb (Kjell and Olson, 2016).

V současné době jsou v klinické praxi používány steroidy, které zmírňují otok míchy, což je známo již dlouhou dobu (Ducker and Hamit, 1969). Přesný mechanismus neuroprotektivního působení kortikosteroidů není znám, nejspíše dochází k inhibici lipidové peroxidace, modulaci zánětu a imunitní odpovědi, zlepšení cévní perfúze a prevenci vniku Ca^{2+} do buněk (Young et al., 1988; Kokoszka et al., 2001).

Dále je registrováno několik klinických studií založených na výsledcích z výzkumu MP na potkanech. Jsou mezi nimi léky jako Methylprednisolon, Gangliosid GM-1, Riluzol, Imatinib nebo modifikovaná forma magnézia. Methylprednisolon je syntetický glukokortikoid, který prošel několika fázemi klinického hodnocení, avšak jeho dávkování a načasování podávání je nejasné a navíc hrozí vedlejší účinky jako vyšší riziko infekce, plicní embolie a další respirační komplikace (Tator, 2002). Gangliosid GM-1 je glykofosfolipid s neuroprotektivním účinkem, který zvyšuje buněčnou regeneraci tkání a potlačuje neurotoxicitu excitačních aminokyselin (Bose et al., 1986). V klinických studiích zlepšuje motorické i sensorické funkce, stejně jako pomáhá funkčnosti střev a močového měchýře u pacientů s nekompletním MP. Bohužel však nemá žádné účinky na pacienty s kompletním přerušením míchy (Geisler et al., 2001). Riluzol je blokátor

sodíkových kanálů schválený pro léčbu amyotrofické laterální sklerózy díky svému neuroprotektivnímu účinku, který se však projeví jen při velmi brzkém podání do 30 minut (Springer et al., 1997; Stutzmann et al., 1996). Imatinib je inhibitor tyrozin kinázy, který je v druhé fázi klinického testování. U potkanů zlepšuje integritu hematoencefalické bariéry, motorické i senzorické funkce (Abrams et al., 2012). Magnézium je vazoprotektivní látka, která významně bojuje proti volným radikálům a působení glutamátu v cévních strukturách po MP. Stimuluje uvolňování endoteliálních prostacyklinů, čímž dochází k dilataci krevních cév zásobujících míchu (Kaptanoglu et al., 2003). V klinických studiích jsou i buněčné terapie s použitím autologních buněk. Experimentální výzkum potenciálních terapií je pro závažnost následků MP velmi intenzivní a široký.

1.5.1 Fotobiomodulace

Termín fotobiomodulace (FBM) je použití laserového světla nebo světlo emitujících diod (light-emitting diodes, LEDs) v červeném až infračerveném spektru (600-1100 nm) ke stimulaci buněčných procesů za účelem terapie. Fotony světelného paprsku po dopadu interagují s biologickou tkání. Většina energie je absorbována, část odražena a část rozptýlena, záleží na vlnové délce a optických vlastnostech tkáně. Výsledky vědeckých studií ukazují pozitivní vliv na redukcí otoku, potlačení zánětu, zlepšení prokrvení tkáně, zvýšení mitochondriálních funkcí a ochranu tkáně před buněčnou smrtí (Hamblin, 2017a; Moreira et al., 2009; Fillipin et al., 2005; Wang et al., 2016; Quirk et al., 2012). Mechanismus účinku FBM je přisuzován absorpci fotonů chromofory v mitochondriích, které jsou zodpovědné za produkci energie v buňkách. Za hlavní absorbující chromofor je považována cytochrom c oxidáza (CCO), která je schopná pohlcovat světlo až do vlnové délky 950 nm (Karu, 2010; Mason et al., 2014). CCO je posledním enzymem mitochondriálního elektronového transportního řetězce a zprostředkovává přenos elektronů z cytochromu c na molekulu kyslíku. Tím se podílí na vytváření protonového gradientu, který je následně enzymem ATP syntázou využíván k tvorbě molekul ATP. Molekula CCO obsahuje prostetické skupiny, které slouží jako redoxní centra: dva hemy a dvě měďnatá centra, která jsou příjemcem fotonu z červeného a blízko červeného světla (Karu, 2010; Karu, 1999; Greco et al., 1989). Absorpce fotonu enzymem CCO může vést ke zvýšené dostupnosti elektronů pro redukcí

molekulárního kyslíku enzymem, což vede ke zvýšené spotřebě kyslíku a produkci ATP (Wang et al., 2016; Lane, 2006). Vliv FBM na CCO byl potvrzen *in vitro* studiiemi na neuronech (Wong-Riley et al., 2001; Wong-Riley et al., 2005).

FBM je v klinické praxi široce používána (Whelan et al., 2001; Rochkind et al., 1989; Geneva, 2016; Chow et al., 2009; Silveira et al., 2016). Klinické studie ukazují terapeutický potenciál pro léčbu traumatických zranění mozku (Hamblin, 2017b; Oron et al., 2007; Naeser et al., 2014), mozkové mrtvice (Yang et al., 2018) a neurodegenerativních onemocnění (Naeser and Hamblin, 2011; De Taboada et al., 2011). Došlo ke zlepšení pracovní paměti, exekutivních funkcí a spánku (Naeser et al., 2014; Morries et al., 2015). Wu a spol. (Wu et al., 2012a) se zabýval porovnáním různých vlnových délek (665, 730, 810 and 980 nm) laserového světla na následky traumatického poranění mozku a zvířata léčená vlnovými délkami 665 nm a 810 nm dosahovala signifikantně nejlepších výsledků. To může být způsobeno absorpčním spektrem CCO, které má maxima v okolí 665 nm a 810 nm (Karu et al., 2005). Anders a spol. (Anders et al., 2014) prokázali efektivitu světla o vlnové délce 980 nm, použili však jiné nastavení ozařování (jinou energetickou hustotu a dávku ozáření než Wu a spol. (Wu et al., 2012a). Fotony uvolněné ze zdroje záření mohou rovněž ovlivnit přenos informací v CNS. FBM (808 nm, 60 J/cm²) je schopná vyvolat uvolňování glutamátu z cerebrokortikálních řezů a glutamátu z vezikul nervových zakončení (Amaroli et al., 2018).

Pár výzkumných skupin se zabývalo i vlivem FBM na zmírnění následků a regeneraci po MP (Byrnes et al., 2005; Kim et al., 2017; Wu et al., 2009). Většina vědeckých skupin používá kontuzní model poranění a jako zdroj světla laser nebo LED světlo. FBM terapie je aplikována skrz kůži s využitím různých nastavení parametrů. Výsledky Paula a spol. (Paula et al., 2014) ukazují rychlejší zlepšení motorických funkcí, pozitivní vliv na ovládání močového měchýře, lepší zachování nervové tkáně v poškozené oblasti a vyšší počet nervových buněk a jejich spojů. Son a spol. (Song et al., 2017) použili FBM k léčbě kontuzního MP a pozorovali polarizaci mikroglíí a makrofágů do M2 fenotypu. Potkani po léčbě dosahovali rovněž vyššího BBB skóre, v místě poranění byl nalezen vyšší počet neuronů a vyšší hladiny IL4 a IL13, což naznačuje potenciální snížení zánětlivé reakce.

Dle studie od Byrnes a spol. je 6 % světla o vlnové délce 810 nm schopno projít míchou (Byrnes et al., 2005). Tato vlnová délka signifikantně zvyšuje počet axonů a potlačuje aktivaci imunitních buněk. Vliv FBM na imunitní buňky potvrdil rovněž Hu a spol. (Hu et al., 2016), pozorovali nižší počet aktivovaných mikroglíí/makrofágů (ED1+) v míše a zbývající mikroglie/astrocyty byly převážně populace M2.

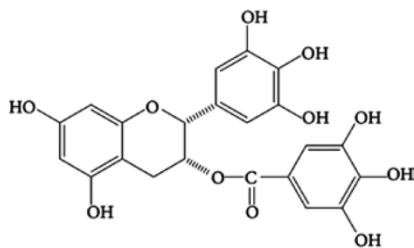
1.6 Přírodní látky ovlivňující sekundární poškození

1.6.1 Epigallocatechin-3-gallát

Rostlinné flavonoidy jsou hydroxylované fenolické látky, které jsou čínskou medicínou využívány po staletí. Mají velkou škálu léčivých účinků působících proti zánětu (Thao et al., 2016), oxidačnímu stresu (Baharfar et al., 2015), virům (Yin et al., 2014), rakovině (Saeed et al., 2015) a kardiovaskulárním onemocnění (Macready et al., 2014).

Epigallocatechin-3-gallát (EGCG) je hlavní aktivní katechin obsažený v zeleném čaji, a je mu proto přisuzována většina biologických účinků extraktů ze zeleného čaje (Kimura et al., 2002). EGCG (Obrázek 6) má antioxidační, protizánětlivé a antiapoptotické účinky na nervovou tkáň. Mnohé studie ukazují vliv této sloučeniny na peroxidaci lipidů, apoptózu nervových buněk, zachování tkáně a zlepšení motorických funkcí (Khalatbary et al., 2010), EGCG rovněž inhibuje indukci iNOS (Khalatbary and Ahmadvand, 2011). Neuroprotektivní efekt této látky byl prokázán u neurodegenerativních onemocnění (Walker et al., 2015; Reznichenko et al., 2010; Xu et al., 2006) i po akutních stavech jako je mozková ischemie (Park et al., 2010), poškození periferních nervů (Kian et al., 2018; Wei et al., 2011) a MP (Khalatbary et al., 2010; Ge et al., 2013). Nedávné studie ukázaly schopnost EGCG snižovat aktivitu myeloperoxidázy a ovlivňovat hladiny prozánětlivých cytokinů TNF α a IL1 β , nitrotyrozinu, iNOS a cyklogenooxidázy-2 (Khalatbary and Ahmadvand, 2011; Alvarez-Perez et al., 2016). Právě modulací zánětlivé odpovědi může EGCG zmírňovat následky sekundárního poškození. Další studie poukazují na anti-oxidační vlastnosti této látky. Ukazují snížení hladiny malondialdehydu a zvýšenou aktivitu superoxid dizmutázy a katalázy (Khalatbary and Ahmadvand, 2011; Kian et al., 2018). Popsány byly také anti-apoptotické vlastnosti, EGCG inhibuje expresi pro-apoptotického proteinu Bax a zvyšuje

proti-apoptický protein Bcl-2 (Khalatbary et al., 2010; Tian et al., 2013; Renno et al., 2015). V míše pak bylo nalezeno méně TUNEL-pozitivních buněk (Khalatbary et al., 2010). Výsledky dalších studií ukazují menší otok míchy po MP u skupiny léčené EGCG, nižší expresi aquaporinu 4 (Ge et al., 2013) a GFAP (Ge et al., 2013; Alvarez-Perez et al., 2016). Aplikace EGCG po akutním poranění i v chronické fázi po MP podpořila zlepšení motorických schopností potkanů i myší, stejně tak měla vliv na sensorické funkce (Khalatbary et al., 2010; Tian et al., 2013; Renno et al., 2014). Navíc došlo ke zvýšené expresi neurotrofického faktoru BDNF a neurotrofického faktoru z gliální linie (Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) v míše (Tian et al., 2013). Míchy zvířat léčených EGCG měly vyšší expresi s růstem asociovaného proteinu 43 (Growth Associated Protein 43, GAP-43), menší oblast léze a větší počet neuronů (Renno et al., 2014).

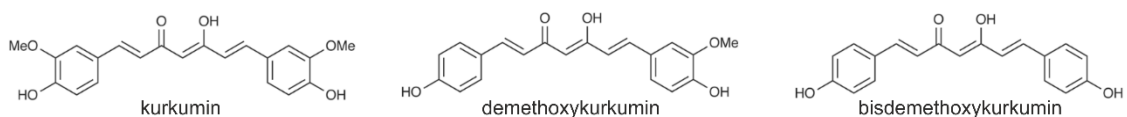


Obrázek 6. Chemická struktura EGCG. Zdroj (Zhang et al., 2017a).

1.6.2 Kurkumin

Kurkumin je žlutě zbarvená složka kurkumy (*Curcuma longa*). Prospěšnost kurkumy (především její protizánětlivá aktivita) byla známa již dlouhá staletí, avšak teprve v předchozích dvou desetiletích byla její protizánětlivá aktivita přisouzena složce kurkuminu (diferuloylmethane). Extrakt kurkumy obsahuje tři hlavní polyfenolové složky (Obrázek 7): kurkumin (60-70%), demethoxykurkumin (20-27%) a bisdemethoxykurkumin (10-15%) (Nelson et al., 2017).

Bylo prokázáno, že kurkumin reguluje množství transkripčních faktorů, cytokinů, proteinových kináz, adhezních molekul a enzymů (Maiti and Dunbar, 2018), které jsou spojené se zánětlivou reakcí. Nedávné studie ukázaly, že kurkumin má řadu biologických aktivit a farmakologických účinků, poskytující protekci a navozující lidské zdraví (Panahi et al., 2015; Yue et al., 2010; Hu et al., 2015).



Obrázek 7 Hlavní složky polyfenolových extraktů kurkumy. Tyto polyfenolové látky jsou často obecně nazývány jako kurkuminoidy a tvoří přibližně 1-6% hmotnosti kurkumy (Priyadarsini, 2014). Kurkuminoidový extrakt je tvořen z 60-70% kurkuminem, z 20-27% demethoxykurkuminem a z 10-15% bisdemethoxykurkuminem (Nelson et al., 2017).

Kurkumin má různorodou aktivitu zahrnující antioxidační, protizánětlivou, imunitu regulující aktivitu a taky intenzivně diskutované prospěšné účinky včetně protektivních a preventivních účinků na kardiovaskulární, gastrointestinální, renální, endokrinní, svalový a nervový systém (Khurana et al., 2013; Vecchi Brumatti et al., 2014; Ghosh et al., 2014; Meng et al., 2013; Peddada et al., 2015; Kulkarni and Dhir, 2010).

Antioxidativní vlastnosti kurkuminu mohou být účinné proti zvýšené tvorbě volných radikálů vyskytujících se v sekundární fázi MP. Obecně je CNS díky vyšším metabolickým nárokům, zvýšené potřebě kyslíku, velkému množství membránových fosfolipidů a nižšímu množství antioxidantů více citlivý k oxidativnímu poškození (Maiti and Dunbar, 2018). Kurkumin je antioxidant schopný vylučovat superoxidové anionty a hydroxylové radikály (Menon and Sudheer, 2007). Dále zvyšuje hladinu antioxidačního enzymu superoxid dismutázy a snižuje oxidativní agens malondialdehyd (Sahin Kavakli et al., 2011; Liu et al., 2013; Akar et al., 2017) a má rovněž vliv na snížení peroxidace lipidů (Akar et al., 2017; Sanli et al., 2012; Alvarado-Sanchez et al., 2019). Také chrání buňky před poškozením jejich DNA, oxidací a karboxylací proteinů (Jat et al., 2013).

Kurkumin má vliv také na zánětlivý proces a počínající fibrózu a vznik gliové jizvy. Tyto procesy hrají při MP velkou roli a často rozhodují o neurologických následcích a symptomech. U potkanů léčených kurkuminem došlo ke snížení protizánětlivých cytokinů TNF α , IL1 β , IL6 a snížení exprese NF κ B a jeho regulátorů (Zhang et al., 2017b; Ni et al., 2015; Yuan et al., 2015).

Expres GFAP a gliová jizva byly redukovány a v léčené skupině byla zvýšena exprese markeru neuronů neurofilament-200 (Yuan et al., 2015; Wang et al., 2014; Lin et al., 2011; Zu et al., 2014; Bang et al., 2018). Po léčbě kurkuminem byl detekován menší počet apoptotických buněk a jejich markerů (Liu et al., 2013; Ni et al., 2015; Lin et al.,

2011; Hao et al., 2017). Na základě histologické analýzy bylo zjištěno lepší zachování míšňní tkáně (Alvarado-Sanchez et al., 2019), menší kavita (Bang et al., 2018) a ve většině studií došlo také k signifikantnímu zlepšení motorických funkcí (Liu et al., 2013; Akar et al., 2017; Alvarado-Sanchez et al., 2019; Zhang et al., 2017b; Yuan et al., 2015; Wang et al., 2014; Lin et al., 2011; Zu et al., 2014; Bang et al., 2018). Kurkumin snižuje otok po MP a snižuje expresi aquaporinů, které zajišťují specifický přenos vody přes buněčnou membránu (Zu et al., 2014). Tato látka má schopnost v nízkých koncentracích stimulovat proliferaci míšňních neurálních progenitorových kmenových buněk (Bang et al., 2018; Son et al., 2014). Dieta obsahující kurkumin zvyšuje hladiny nervového růstového faktoru (nerve growth factor, NGF), BDNF a GDNF *in vivo* (Gupta et al., 2011).

Hlavní nevýhodou této sloučeniny je jeho nedostatečná biologická dostupnost v séru a tkáních, což je převážně způsobeno jeho rychlou metabolizací v játrech a střevech (Anand et al., 2007; Sharma et al., 2007). Řešení tohoto problému by mohla být úprava vlastností této molekuly přes vytváření komplexů s fosfolipidy, cyklodextriny a další látky (Bisht et al., 2007; Tiyaboonchai et al., 2007; Nair et al., 2019).

Pro naši studii jsme použili vysoce čistý kurkumin spojený s Lipodisq™ (Malvern Cosmeceutics, VB), což jsou lipidové diskoidní nanočástice o průměru 10 – 25 nm, které jsou biodegradabilní a mohou do nich být inkorporovány hydrofobní a špatně rozpustné sloučeniny určené pro tropické i systémové podání. Samotný kurkumin je rozpustný v organických rozpouštědlech a není rozpustný ve vodě, avšak nanokurkumin (kurkumin spojený s Lipodisq™) je rozpustný ve vodě i fyziologickém roztoku.

Výsledky studii poukazují na rozdílný efekt nízkých a vysokých koncentrací kurkuminu. Zatímco v nízkých dávkách má tato látka neuroprotektivní a další prospěšné účinky, při příliš vysokých dávkách je pro buňky toxická (Cole et al., 2004). Vysokých koncentrací se však díky jeho špatné dostupnosti dosahuje velmi těžce, to se však může změnit s úpravou vlastností a zvýšenou dostupností díky komplexům, proto je nutné každý nový preparát testovat pro nalezení optimální koncentrace a hladiny.

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studium nových možností terapie experimentálních modelů MP u potkanů se zaměřením na sekundární fázi poškození. Byl hodnocen vliv jednotlivých terapií na poraněnou míšní tkáň.

2.1 Hypotézy

1. Aplikace FBM snižuje rozvoj MP a lze jí dosáhnout funkčního zlepšení po MP.
2. EGCG ovlivňuje prozánětlivou dráhu nukleárního faktoru kappa B (NFκB) a tím mírní následky experimentálního MP u potkana.
3. Kombinace EGCG s protizánětlivou látkou kurkumin by mohla mít synergický efekt při léčbě MP.
4. Aplikace vysoce čistého syntetického kurkuminu navázaného na nanonosič má protizánětlivé účinky a může modulovat sekundární reakci po MP

2.2 Cíle

1. Aplikace laserového světla dvou vlnových délek 808nm a 905nm po experimentálním MP a pomocí behaviorálních testů, histologické a imunohistochemické analýzy poškozené míchy sledovat efekt léčby.
2. Sledování vlivu aplikace EGCG na aktivitu dráhy NFκB, hladiny cytokinů a fenotyp makrofágů po MP.
3. Zhodnocení synergického vlivu kombinace EGCG a kurkuminu pomocí morfometrických a imunohistochemických analýz a porovnání s aplikacemi jednotlivých látek.
4. Potkanům s balónkovou kompresní lézí podat syntetický nanokurkumin a pomocí behaviorálních testů, stanovení genové exprese cytokinů, histologické a imunohistochemické analýzy ověřit účinnost léčby.

3 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

3.1 Pokusná zvířata a etické prohlášení

K experimentům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar, kteří byli chováni v klecích v párech za stálých teplotních podmínek (22 °C) a při 12h cyklu světlo/tma. Měli k dispozici potravu a vodu *ad libidum*. Všechny experimenty byly provedeny v souladu se směrnicemi Evropské rady ze dne 22. září 2010 (2010/63/EU) zabývající se použitím zvířat ve výzkumu. Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AVČR.

3.2 Míšní poranění

V experimentech jsme použili model balónkové kompresní léze, jejíž postup byl publikován již dříve (Vanicky et al., 2001). Potkani byli uspáni 2-3% isofluranem (Forane, Abbott Laboratories, UK). Kůže byla rozstřížena v dorzomediálním směru od Th8 po Th12. Měkké tkáně a výběžky obratlů Th10 a Th11 byly odstraněny. V místě obratle Th10 byla vytvořena laminektomie a vzniklým prostorem byl do epidurálního prostoru vsunut Fogartův katetr (Baxter, Irvine, USA). Střed balónku katetru byl umístěn na úroveň míšního segmentu Th8, poté byl rychle naplněn 15 μ l vody, čímž byla způsobena míšní komprese. Po 5 minutách byl katetr rychle vyfouknut a vyjmut. Měkké tkáně byly sešity po anatomických vrstvách. Jako prevenci infekce a bolesti zvířata dostávala gentamicin sulfát (Lek Pharmaceutical, Slovinsko, 5 mg/kg) a carprofen (Rimadyl, Pfizer, USA, 7,5 mg/kg). Pooperativní péče zahrnovala manuální vyprazdňování močového měchýře.

3.3 Experimentální léčba

3.3.1 Ozařování laserovým světlem

Experimentální léčba byla prováděna pomocí Multiwave Locked System laseru (Mphi laser, ASA Srl, Itálie). Tento přístroj vyzařuje světlo o vlnové délce blízké infračervenému poli a obsahuje dva synchronizované zdroje (laserové diody). První z nich je pulzní diodový laser emitující světlo o vlnové délce 905 nm, druhá laserová dioda emituje kontinuální světlo o vlnové délce 808 nm. Oba laserové paprsky jsou synchronizované.

Ihned po MP byla zvířata rozdělena do dvou skupin náhodným výběrem. První skupina (laserem léčená, n=15) byla vystavena laserové terapii 15 minut po MP, a poté každý den po dobu 10 dní. Ozáření (3 cm²) bylo směřováno na místo poranění a zdroj byl umístěn do výšky 3 cm nad zvíře. Délka ozařování byla 9 minut a 5 vteřin a parametry byly nastaveny následovně: 10 Hz, CPW, 100% intenzita, 299.946 J/celek. Kontrolní skupina (n=11) byla pouze uspána celkovým anestetikem po dobu 9 minut a 5 vteřin.

3.3.2 EGCG

Roztok EGCG (50 mg/kg, ředěno ve fyziologickém roztoku v objemu 10 µl, Sigma-Aldrich, USA) byl aplikován přímo na povrch míchy ihned po MP, a poté 7., 14., 21. a 28. den po MP. Mezitím zvířata dostávala denně intraperitoneální injekce EGCG (50 mg/kg, objem 30 µl ve fyziologickém roztoku). Kontrolní skupině byl aplikován pouze samotný fyziologický roztok.

3.3.3 EGCG a kurkumin

Roztok EGCG (17 mg/kg, ředěno ve fyziologickém roztoku), kurkuminu (60 mg/kg, ředěno v olivovém oleji) nebo jejich kombinace byla ihned podána intramuskulárně do svalů okolo páteře v blízkosti MP, a poté 7., 14., 21. a 28. den po MP. Zvířata současně dostávala denně intraperitoneální injekce EGCG (17 mg/kg (Tian et al., 2013; Renno et al., 2015)), kurkuminu (6 mg/kg (Ormond et al., 2014)) nebo jejich kombinace. Kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok.

3.3.4 Nanokurkumin

Nanokurkumin (syntetický kurkumin bez demethoxy- a bis-demethoxykurkuminu a zbavený 30 – 40% nečistot nacházejících se v jiných kurkuminových preparátech, Innaxon, Bristol) byl aplikován přímo na míchu (0,1 ml) ihned po poranění a poté každý týden do 28. dne po MP. Zvířata také dostávala dvakrát denně subkutánní injekci 0,1 ml roztoku nanokurkuminu první 4 týdny po MP. Kontrolní skupině zvířat byl aplikován nanonosič bez molekul kurkuminu.

3.4 Behaviorální testování

3.4.1 BBB test

Pro zhodnocení pohybové aktivity po MP jsme použili Basso, Beattie a Bresnahan test (Basso et al., 1995). Škála hodnocení BBB má rozsah od 0 do 21 a odráží rozsah pohybu v kloubech zadních končetin, podporu váhy, umístění packy a koordinace předních a zadních končetin. Každá končetina byla hodnocena zvlášť, a poté byly hodnoty pro obě nohy zprůměrovány pro další zpracování výsledků. Tento test byl prováděn každý týden od prvního týdne po MP.

3.4.2 Plantar test

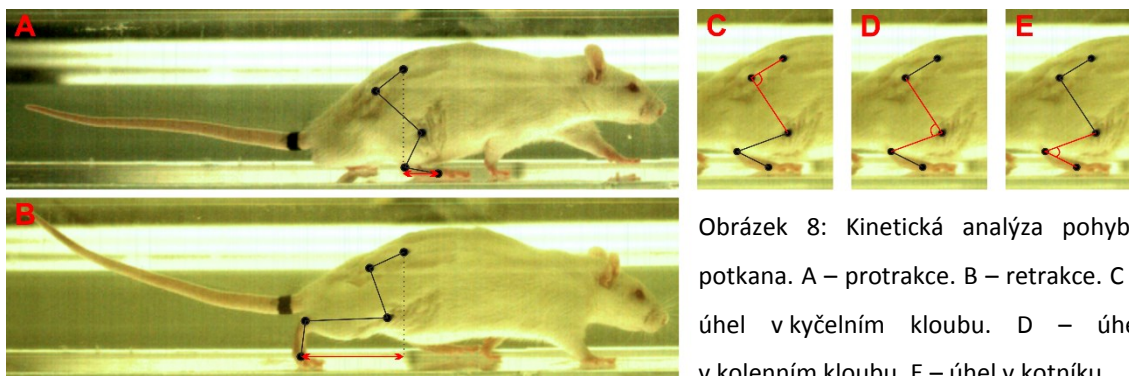
K testování senzitivity zadní tlapky vůči teplotnímu podnětu sloužil přístroj Ugo Basile (Ugo Basile, Itálie). Potkan v průhledném boxu měl pod centrální částí zadní tlapky umístěný infračervený zdroj tepla. Měřili jsme dobu od spuštění zdroje po ucuknutí. Měření bylo prováděno pětkrát pro každou končetinu a nejvyšší a nejnižší hodnota byly vyřazeny z analýzy. Testovali jsme jednou před MP, a poté jednou týdně od prvního týdne po MP. Hyperalgezie byla definována jako signifikantní pokles času ucuknutí.

3.4.3 Chůze po tyči

Při chůzi po tyči jsme hodnotili komplexní motorický výkon a koordinaci předních a zadních končetin. Úkolem potkana je přejít 140 cm dlouhou a 3 cm širokou dřevěnou obdélníkovou tyč a vejít do tmavé krabice umístěné na konci tyče. Pro hodnocení je použita pouze střední 1 metr dlouhá část tyče. V průběhu testování je pomocí kamerového systému (TSE Systems, Německo) měřena doba potřebná k přejití tyče (max. 60 vteřin) a je hodnocen pohyb zadních končetin a jejich koordinace sedmibodovou stupnicí. Nulová hodnota znamená neschopnost potkana udržet se na tyči a přejít ji. Sedm bodů znamená přejití celé délky tyče při správném použití obou zadních končetin. Zvířata byla trénována jeden týden před operací, a poté testována od třetího týdne po MP. Test byl prováděn třikrát v týdnu každým zvířetem dvakrát.

3.4.4 Kvantifikace lokomoce

Ke kinematické analýze pohybu jsme využili přístroj MotoRater (TSE systems, Německo)(Zorner et al., 2010). Potkani byli trénováni přejít osvětlený skleněný koridor a vejít do tmavé krabice umístěné na konci. Průběh experimentu zaznamenávala spodní mobilní vysokorychlostní kamera se záznamem 200 snímků za vteřinu. Po stranách koridoru jsou umístěna 2 zrcadla natočená tak, aby umožňovala záznam pohybu ze třech stran. Před samotným testováním byla kůže potkanů na místech odpovídající kloubům zadních končetin (hřeben kosti kyčelní - HKK, kyčelní kloub, kolena, kotník, 5. metatarzofalangeální kloub) tetována. Zvířata byla trénována týden před operací a testování proběhlo v 5. a 9. týdnu po MP. Pro každé zvíře bylo pořízeno 4 – 6 záznamů, z toho 3 reprezentativní byly použity pro analýzu pomocí softwaru TSE Motion (TSE Systems, Německo). První a poslední krok byl vyloučen z analýzy. Parametry pro analýzu jsme definovali následovně: výška HKK jako maximální vertikální vzdálenost mezi HKK a podlahou, protrakce a retrakce zadní končetiny jako maximální horizontální pozitivní (protrakce) nebo negativní (retrakce) vzdálenost metatarzofalangeálního kloubu a HKK. Dále jsme měřili rozsah pohybu v kyčelním, a kolenním kloubu a kotníku pro obě končetiny (Obrázek 8). Získané hodnoty byly vypočítány pro obě končetiny, a poté byly zprůměrovány pro výslednou analýzu.



3.5 Zpracování tkáně

Zvířata byla transkardiálně perfundována 9 týdnů po MP ledovým 4% paraformaldehydem (Penta s.r.o., ČR) naředěným ve fosfátovém pufru. Páteře byly dodatečně fixovány přes noc, a poté byly míchy opatrně vyjmuty z páteřního kanálu. Do

parafínu zalité 3 cm dlouhé míšní segmenty s epicentrem uprostřed byly transverzálně nakrájeny na 5 μm tenké řezy.

3.6 Histologická analýza

Zachovanou šedou a bílou hmotu jsme analyzovali pomocí barvení Luxol-Fast Blue a kresolovou violetí (Sigma-Aldrich, USA). Pro morfologické měření bylo vybráno 15 řezů s rozestupem 1 mm podél kranio-kaudální osy, které jsme nasnímali na mikroskopu Axioskop 2 plus (Carl Zeiss AG, Německo) a analyzovali softwarem ImageJ (National Institutes of Health, USA). Na každém řezu byla vypočtena plocha zachované tkáně (mm^2). Střed léze byl určen jako nejmenší zachovalá plocha míchy.

3.7 Imunohistochemická analýza

Pro zhodnocení růstu nových kolaterál (axonal sprouting) jsme transversální míšní řezy obarvili protilátkou proti proteinu GAP43 (Growth associated protein 43; 1:2000, Millipore, USA) v kombinaci se sekundární kozí protilátkou proti myši IgG konjugovanou s Alexa-Fluor 488 (1:200, Abcam, UK). Obrázky byly pořízeny s vysokým rozlišením mikroskopem LEICA CTR6500 (TissueGnostics, Rakousko) a pro analýzu GAP43 pozitivních vláken byl použit software TissueQuest (TissueGnostics, Rakousko).

Astroglíózu jsme hodnotili pomocí protilátky proti GFAP konjugované s fluoroforem indotrimethinecyaninem v koncentraci 1:400 nebo 1:300 (Sigma Aldrich, USA). Pro analýzu aktivace mikroglíí byly řezy inkubovány s primární kozí protilátkou anti-IBA1 (1:500, Abcam, VB), následně se sekundární biotinylovanou králičí protilátkou IgG a streptavidin-peroxidázou (Vector Laboratories, USA). Komplex byl vizualizován 3, 3'-diaminobenzidinem (Vector Laboratories, USA) a řezy dobarveny hematoxylinem. Makrofágy jsme detekovali pomocí barvení CD68 (1:75, Bio-Rad, USA) a sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa-Fluor 594 (1:500, Abcam, VB) a CD206 protilátkou (1:200, Abcam, VB) s použitím sekundární protilátky konjugované s Alexa-Fluor 488 (1:200, Abcam, VB).

Počet protoplazmatických astrocytů, mikroglíí a M2 mikroglíí/makrofágů jsme analyzovali softwarem ImageJ. Za M2 mikroglie/makrofágy byly počítány buňky pozitivně nabarvené na CD68 (společný marker mikroglíí/makrofágů) i CD206 (selektivní

marker M2 mikroglií/makrofágů). GFAP pozitivní plochy řezu kolem kavity jsme hodnotili pomocí softwaru ImageJ nebo TissueQuest software.

Aktivaci prozánětlivé dráhy NFκB jsme sledovali pomocí jaderné translokace proteinu p65 králičí protilátkou proti p65 (Santa Cruz, Dallas, USA) a sekundární kozí protilátkou IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou H (Vector Laboratories, USA). Následně byl na vzorky přidán 3, 3'-diaminobenzidin a peroxid vodíku k vytvoření hnědého precipitátu. Řezy byly dobarveny hematoxylinem. K analýze počtu jader s translokovaným p65 byl použit software HistoQuest (TissueGnostics, Rakousko).

3.8 qRT-PCR

Genovou expresi jsme stanovovali kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (qRT-PCR). Hodnotili jsme geny relevantní pro regeneraci tkáně sortilin 1 (*Sort1*), fibroblastový růstový faktor 2 (*Fgf2*), kaspáza 3 (*Casp3*), argináza 1 (*Arg1*), *Cd86*, *Cd163*, manózoový receptor C typu 1 (*Mrc1*), interferon regulující faktor 5 (*Irf5*), *Nfkb1*, ciliární neurotrofický faktor (*Cntf*), *Gap43*, oligodendrocytární transkripční faktor 2 (*Olig2*), *Gfap* a vaskulární endotelový růstový faktor (*Vegf*) v různých časových úsecích po MP. Dále jsme zjišťovali expresi genů cytokinů/chemokinů spojených se zánětlivou reakcí *Il1b*, *Tnfa*, *Ifny*, *Il6*, *Il10*, *Il11*, *Il12*, *Il13* a *Ccl5* v době 1 a 14 dní po MP.

RNA byla izolována z parafínových řezů pomocí kitu High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Německo) dle doporučeného postupu výrobce. Izolovanou RNA jsme kvantifikovali spektrometrem (NanoPhotometer™ P-Class, Německo). K reverzní transkripci do cDNA byl použit transkriptor Universal cDNA Master (Roche, Německo) a termocykler (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, USA). Směs pro qRT-PCR obsahovala roztok cDNA, FastStart Universal Probe Master (Roche, Německo) a TaqMan® esej pro kvantifikaci genové exprese (Life Technologies, USA). Výsledný objem reakční směsi pro qRT-PCR byl 10 µl a obsahoval 25 ng extrahované RNA. Amplifikace proběhla na termocykleru StepOnePlus™ (Life Technologies, USA) a podmínky amplifikace byly nastaveny následovně: 2 min 50°C, 10 min 95°C, 40 cyklů 15 s 95°C a 1 min 60°C. Všechny vzorky jsme připravili v duplikátech a v každá esej zahrnovala negativní kontrolu pro každý gen. Výsledky byly analyzovány pomocí softwaru StepOnePlus® (Life Technologies, USA). Úroveň genové exprese byla normalizována podle referenčního genu *Gapdh*. Pro relativní kvantifikaci genové exprese byla použita metoda $\Delta\Delta Ct$,

kontrolní skupina zvířat byla počítána jako nulová hodnota. V grafech je vyjádřena zvýšená či snížená míra exprese pomocí log₂ měřítka.

3.9 Analýza cytokinů

Hladina cytokinů v míšní tkáni byla stanovována 1, 3, 7, 10 a 14 dní po MP. Potkan byl usmrcen dekapitací, páteř byla rychle vyjmuta a umístěna na led, byla vyňata mícha a její 2 mm dlouhý segment s epicentrem uprostřed byl vyříznut a inkubován 24 hod v kultivačním médiu (DMEM, Sigma Aldrich, USA) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum a 0,2% primocin. Poté bylo kultivační médium odsáto a hladina cytokinů v něm byla určena s použitím Milliplexového kitu pro stanovení zánětlivých cytokinů (Millipore, USA). Sledovali jsme hladiny potkaních cytokinů IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL12p70, TNF α , MIP1 α a CCL5. Eseje proběhly v 96 - jamkových destičkách dle návodu výrobce. Koncentrace částic konjugovaných s protilátkou byla použita 5000 částic na jeden marker a byly inkubovány se vzorkem přes noc. Ke vzorku byla přidána protilátka značená biotinem a streptavidin-R-Phycoerythrin (Life Technologies, USA) a hladinu cytokinů jsme měřili přístrojem Luminex xMAP 200 (Luminex, USA). Data byla zpracována v softwaru Magpix instrumentation. Pro výpočet koncentrace každého z cytokinů (ng/ μ L) jsme použili střední intenzitu fluorescence a standardní křivku. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento změny léčené skupiny vůči kontrolní skupině (100%).

3.10 Statistická analýza

Pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými skupinami jsme použili několik statistických testů. Behaviorální testy, hodnocení šedé a bílé hmoty, gliové jizvy, aktivace mikroglíí a počet protoplazmatických astrocytů jsme analyzovali dvoucestnou ANOVOU pro opakovaná měření s následným post-hoc testem Student-Newman-Keuls. Pro kvantitativní analýzu pohybu byla použita jednocestná analýza rozptylu (Analysis of variance, ANOVA) s použitím Newman-Keuls mnohočetného srovnávacího testu. Dvě skupiny v jednom časovém úseku jsme porovnávali studentovým nepárovým T-testem s Mann Whitney testem. Pro analýzu NF κ b byla použita trojcestná ANOVA. Dvě skupiny ve více časových úsecích (qRT-PCR, cytokiny) jsme hodnotili dvoucestnou ANOVOU s následným post-hoc testem Student-Newman-Keuls.

Všechna data v grafech jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (standard error of the mean, SEM). Statistická signifikance je v grafech vyjádřena následovně: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Statistická analýza byla provedena v softwaru GraphPad Prism5 (San Diego, USA) nebo SigmaStat software (Sistat Software Inc., USA).

4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv laserového světla o vlnové délce 808 a 905 nm na regeneraci po MP

Výsledky v této kapitole jsou založeny na datech z článku:

Svobodova, B.; Kloudova, A.; Ruzicka, J.; Kajtmanova, L.; Navratil, L.; Sedlacek, R.; Suchy, T.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P.; Machova Urdzikova, L. The effect of 808 nm and 905 nm wavelength light on recovery after spinal cord injury. Sci Rep. 2019 May 21;9(1):7660.

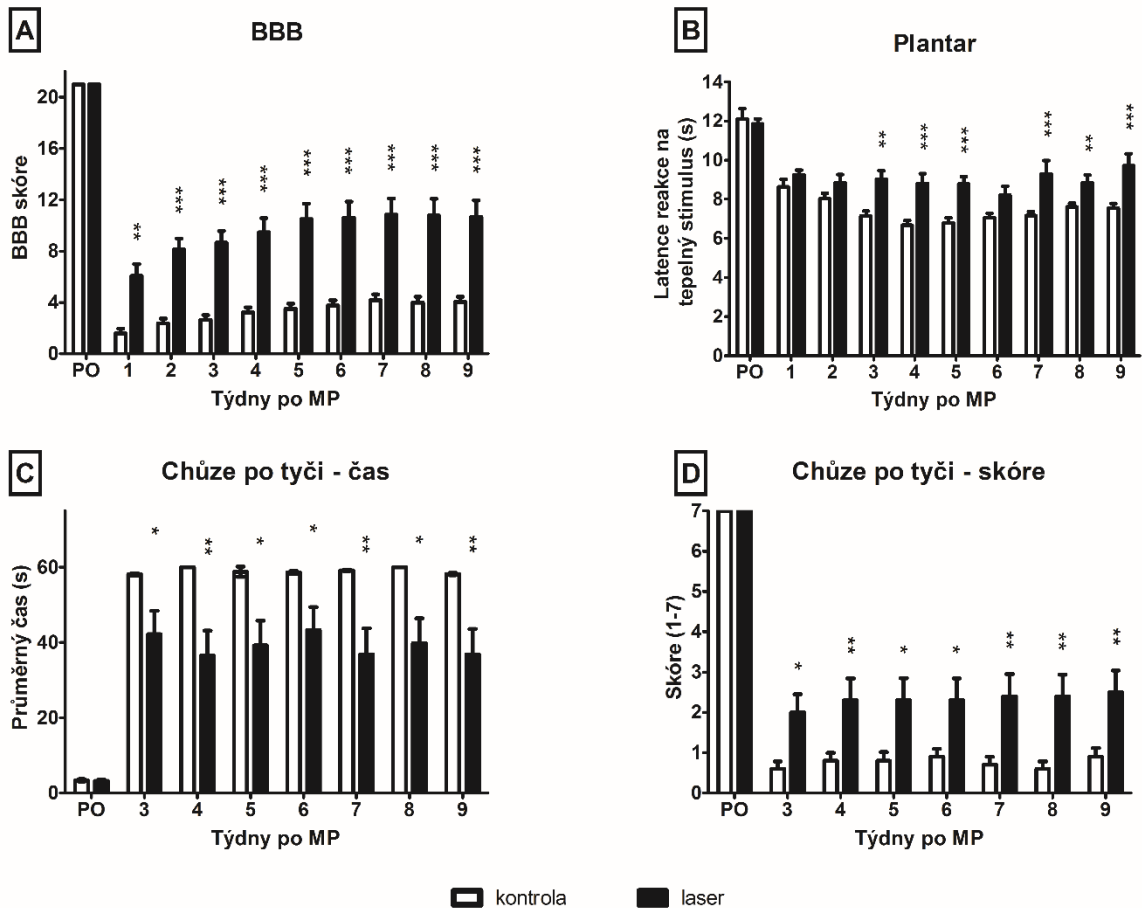
V této publikaci se zabýváme léčbou MP pomocí FBM. Použili jsme komerčně dostupný a klinicky schválený laser s MLS systémem. Ten kombinuje dvě vlnové délky (808 nm a 905 nm), jejichž synchronizované pulzy by měly dosahovat efektivnějších výsledků léčbou FBM díky lepší distribuci energie do tkáně.

4.1.1 Motorika a senzitivita zadních končetin

Zlepšení funkčních motorických a senzitivních schopností po opakované aplikaci FBM jsme otestovali sérií testů: BBB test, plantar test, chůze po tyči a kinematická analýza záznamu chůze potkana. Výsledky BBB testu ukázaly signifikantní zvýšení bodového skóre od prvního týdne po MP přetrvávající až do ukončení experimentu 9. týden (Obrázek 9 – A).

Doba ucuknutí zadní packy po tepelném stimulu je po MP zkrácena z důvodu hyperalgie. U laserem léčené skupiny zvířat došlo k signifikantnímu prodloužení doby odpovědi v 3. až 5. týdnu a v 7. až 9. týdnu po MP (Obrázek 9 – B). Od 3. týdne po MP byl zařazen test chůze po tyči, který hodnotí zlepšení koordinace a motoriky při úkolu vyžadujícím přesnější jemné pohyby. Úkolem je přejít 3 cm širokou plochou tyč za čas kratší než 60 vteřin. Během testu je hodnocena rovnováha, schopnost udržet se na tyči, pohyb zadních končetin a je měřen čas potřebný k přejití střední části tyče. Laserem léčená skupina zvířat dosahovala lepších výsledků. 7 z 15 potkanů léčené skupiny bylo schopno přejít tyč, oproti 1 z 11 potkanů kontrolní skupiny (Obrázek 9 – C). Také bodové

hodnocení pohybu bylo u léčené skupiny signifikantně vyšší po celou dobu trvání experimentu (Obrázek 9 – D).

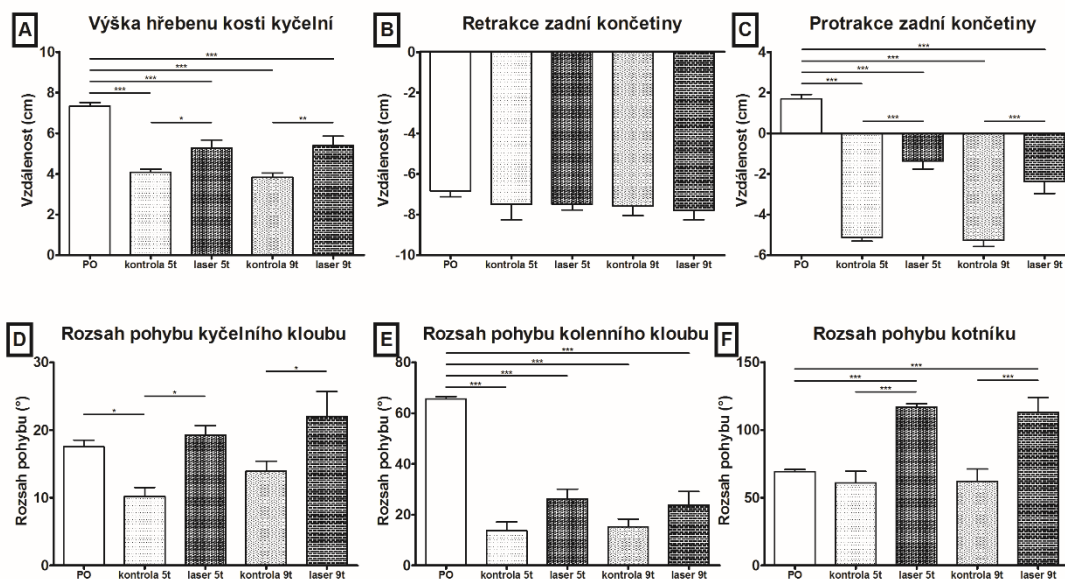


Obrázek 9. Behaviorální efekt léčby laserem. (A) Výsledky hodnocení lokomočních dovedností pomocí BBB testu. (B) Vliv terapie na termální nocicepci sledovanou plantar testem. (C, D) Hodnocení komplexních motorických schopností pomocí testu chůze na tyči. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. Kontrolní skupina n=15, léčená skupina n=11. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. PO – před operací.

V 5. a 9. týdnu byla chůze obou skupin potkanů zaznamenána pomocí přístroje MotoRater. Tento záznam byl použit ke kvantitativní analýze. MP způsobilo vážné poškození motorických funkcí, které nebyly plně obnoveny ani po 9 týdnech. Zvířata z kontrolní skupiny při pohybu používala především přední končetiny a táhla zadní nohy za sebou bez jakékoliv podpory váhy, o čemž vypovídá snížená výška HKK. Zdravá zvířata se přes koridor pohybovala s pomocí zadních končetin s částečnou podporou váhy, jejich výška HKK byla signifikantně zvýšena v obou sledovaných časových úsecích, avšak tyto hodnoty nedosahovaly hodnot zdravých zvířat (Obrázek 10 – A).

Kinematická analýza zahrnovala rovněž výpočet maximální pozitivní a negativní výchylky zadní končetiny v horizontálním směru (protrakce a retrakce). V hodnotách retrakce (negativní výchylka končetiny směrem k ocasu) nebyl nalezen rozdíl mezi experimentálními skupinami (Obrázek 10 – B). Naopak výsledky analýzy protrakce (pozitivní výchylka končetiny směrem k hlavě) ukázaly signifikantní zlepšení u laserem léčené skupiny a přiblížení k hodnotám zdravých zvířat (Obrázek 10 – C).

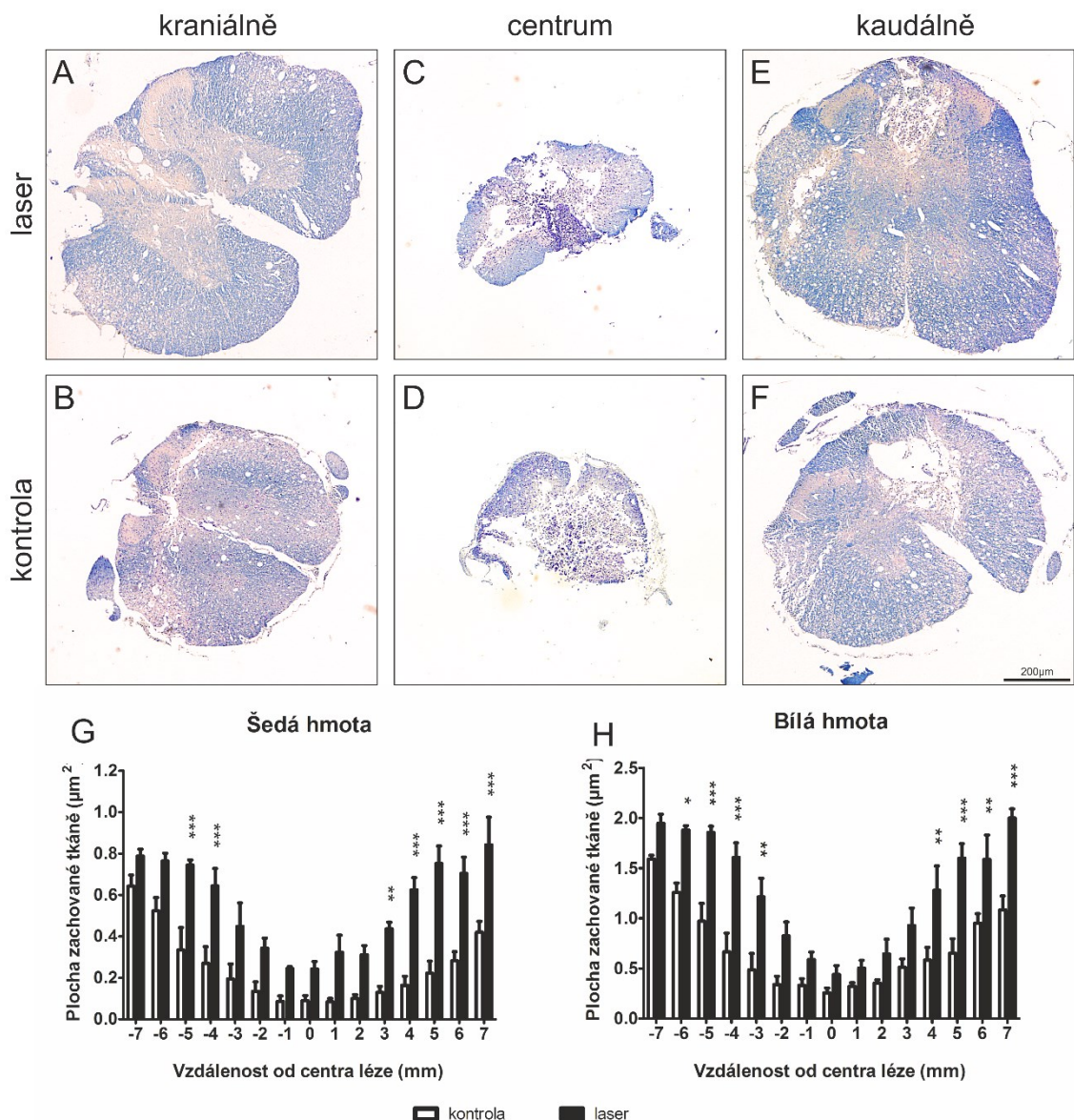
Dále jsme hodnotili rozsahy jednotlivých kloubů zadních končetin (Obrázek 10 – D - F). Laserem léčená skupina měla v kyčelním kloubu stejný rozsah jako skupina zdravých zvířat. Kontrolní skupina měla rozsah pohybu tohoto kloubu v 5. týdnu signifikantně snížený oproti zdravým i léčeným zvířatům a v 9. týdnu po MP bylo snížení signifikantní pouze vůči laserem léčeným zvířatům. Při porovnání rozsahu pohybu v kolenním kloubu kontrolních a laserem léčených zvířat nebyl nalezen rozdíl, obě skupiny měly rozsah v tomto kloubu v obou časových intervalech značně snížen v porovnání se zdravými zvířaty. Rozsah pohybu v kotníku byl signifikantně zvýšen u laserem léčené skupiny v obou časových intervalech vůči kontrolní skupině i vůči skupině zdravých zvířat. Rozsah pohybu v kotníku kontrolních zvířat se nelišil od zdravých zvířat.



Obrázek 10. Kvantifikace lokomoce. (A) Výška HKK byla definována jako vertikální vzdálenost mezi podlahou a HKK. (B) Negativní maximální horizontální vzdálenost (retrakce) metatarzofalangeálního kloubu a hřebenu kosti kyčelní. (C) Pozitivní maximální horizontální vzdálenost (protrakce) metatarzofalangeálního kloubu a hřebenu kosti kyčelní. (D-F) Rozsah pohybu v jednotlivých kloubech. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. $n=5$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. PO – před operací.

4.1.2 Zachování šedé a bílé hmoty míšň

Pomocí barvení Luxol-Fast Blue a kresolovou violetí jsme hodnotili zachování bílé a šedé hmoty 9 týdnů po MP (Obrázek 11). Oba typy míšň tkáně byly více zachovány u laserem léčené skupiny zvířat v kraniální a kaudální části míchy směrem od středu léze. V případě zachování šedé míšň hmoty bylo signifikantně větší zachování tkáně nalezeno 4-5 mm kraniálně a 3-7 mm kaudálně od centra léze. Bílá hmota míchy laserem léčené skupiny byla signifikantně více zachována 3-6 mm kraniálně a 4-7 mm kaudálně od centra léze.

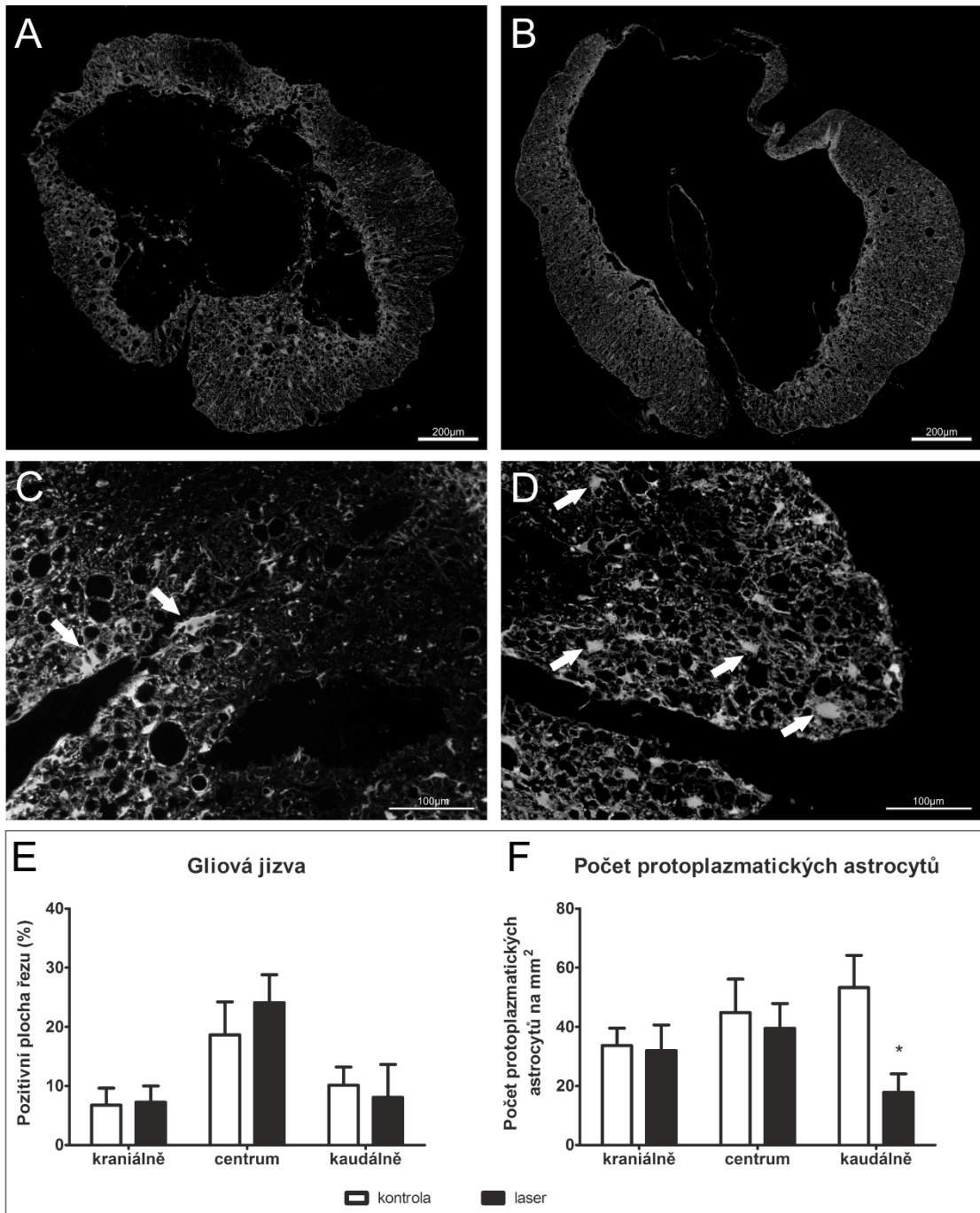


Obrázek 11. Zachování šedé a bílé hmoty. (A-F) Reprezentativní obrázky míšních řezů nabarvených Luxol-Fast Blue a kresolovou violetí 9 týdnů po MP. (G, H) Morfometrická analýza zachování šedé a bílé míšní hmoty. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. $n=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

4.1.3 Gliová jizva

Reaktivní astrogliózu jsme hodnotili v kraniální (-3 mm, -2 mm), centrální (-1 mm - + 1 mm) a kaudální (+ 2 mm, + 3 mm) části míchy na transverzálních řezech nabarvených protilátkou anti-GFAP (Obrázek 12 A - B). Při porovnání kontrolní a laserem léčené skupiny jsme nedetekovali signifikantní rozdíl v žádné části míchy (Obrázek 12 - E). Dále jsme hodnotili množství protoplazmatických astrocytů (Obrázek 12 C - D), které jsou přepočítány na mm^2 . V kraniální a centrální části míchy nebyl nalezen signifikantní

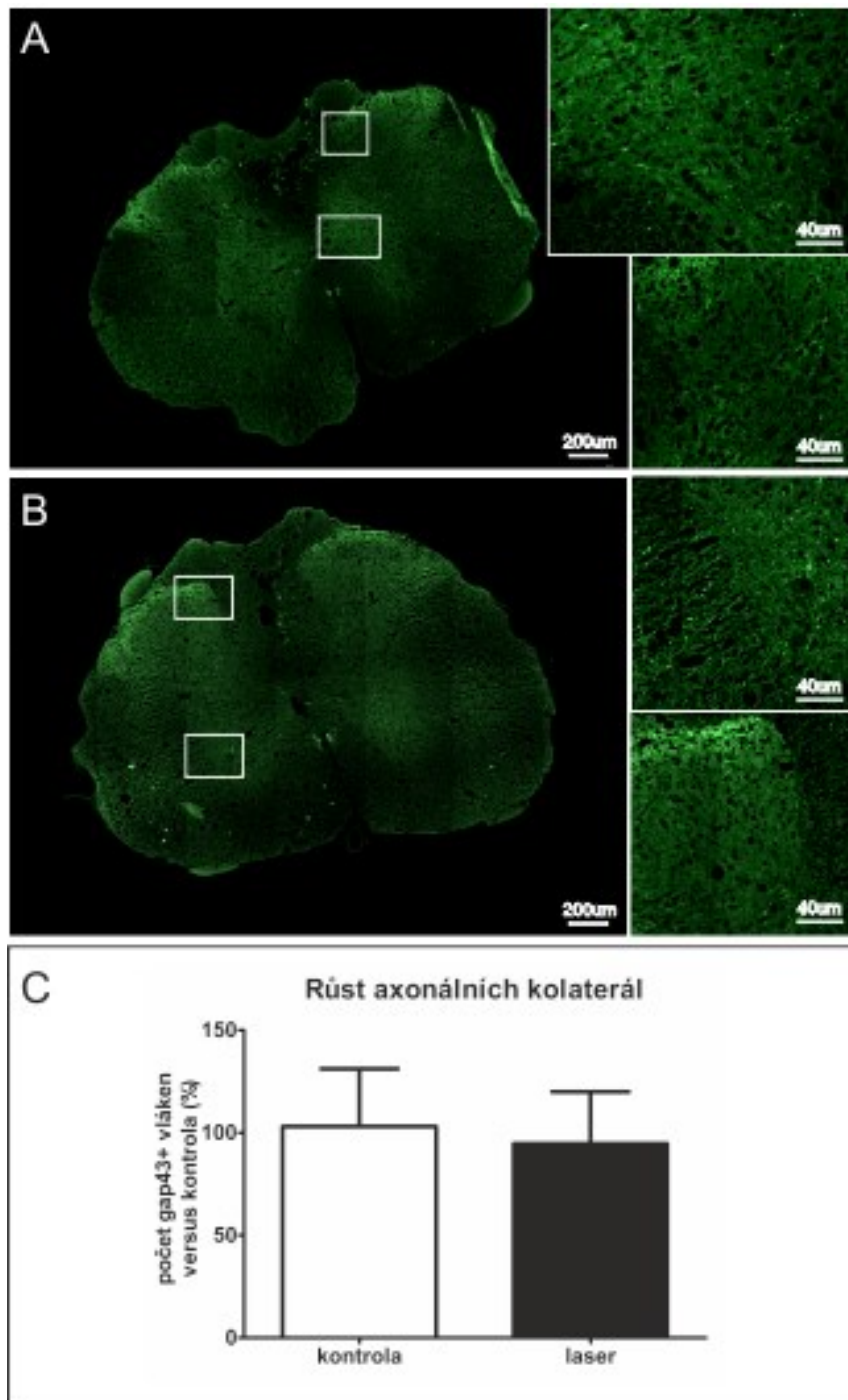
rozdíl, avšak v kaudální části byl snížen počet protoplazmatických astrocytů u laserem léčené skupiny (Obrázek 12 – F).



Obrázek 12. Hodnocení gliové jizvy. (A-D) Reprezentativní obrázky GFAP barvení pro určení plochy gliové jizvy (A,B,E) a počtu protoplazmatických astrocytů (C,D,F) – vyznačeno bílými šipkami. (A, C) – laser, (B, D) – kontrola. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. n=6. * $p < 0.05$.

4.1.4 Růst axonálních kolaterál

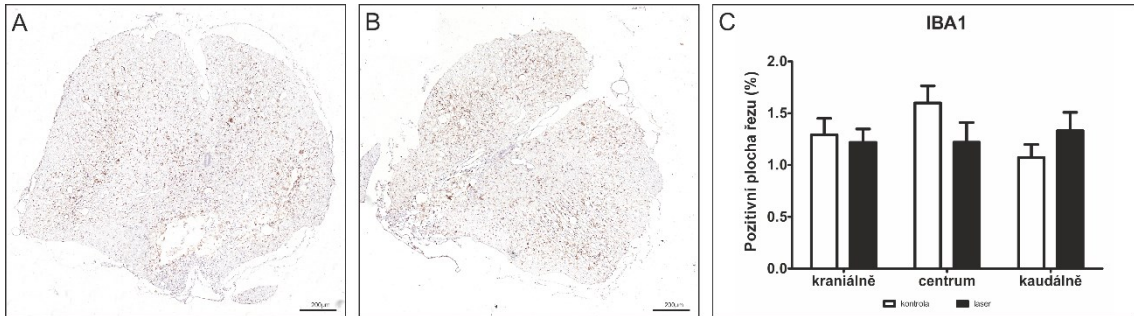
Nově rostoucí axonální vlákna jsme detekovali barvením proti GAP43. Nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami (Obrázek 13).



Obrázek 13. Růst nových axonálních kolaterál. (A, B) Reprezentativní obrázky barvení GAP43 (A) – laser, (B) – kontrola. (C) Kvantitativní hodnocení GAP43⁺ axonálních kolaterál. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. n=6.

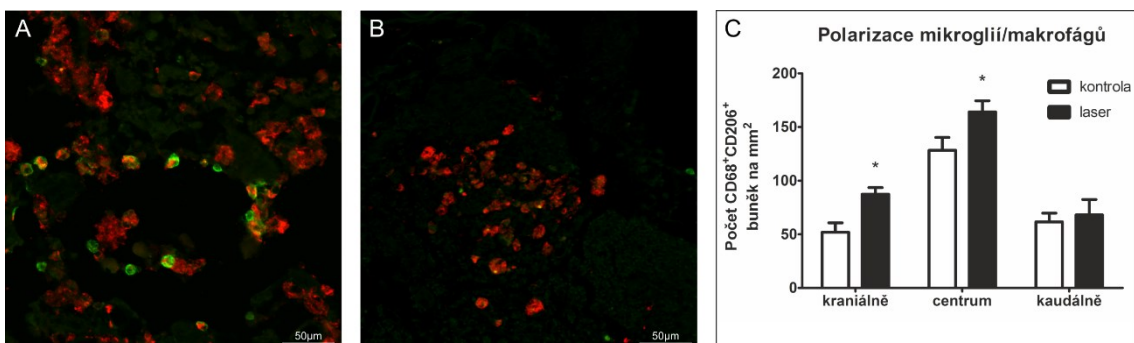
4.1.5 Analýza mikroglíí/makrofágů

Pro analýzu aktivace mikroglíí/makrofágů jsme využili marker IBA1. Při porovnání kontrolní a laserem léčené skupiny nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl (Obrázek 14).



Obrázek 14. Vliv FBM na aktivaci mikroglíí/makrofágů. (A, B) Repräsentativní obrázky IBA1 barvení (A) – laser, (B) – kontrola. (C) Kvantifikace IBA1 pozitivní plochy v kraniiální (-3 mm, -2 mm), centrální (-1 mm - + 1 mm) a kaudální (+ 2 mm, + 3 mm) části míšné léze. V grafch jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. n=6.

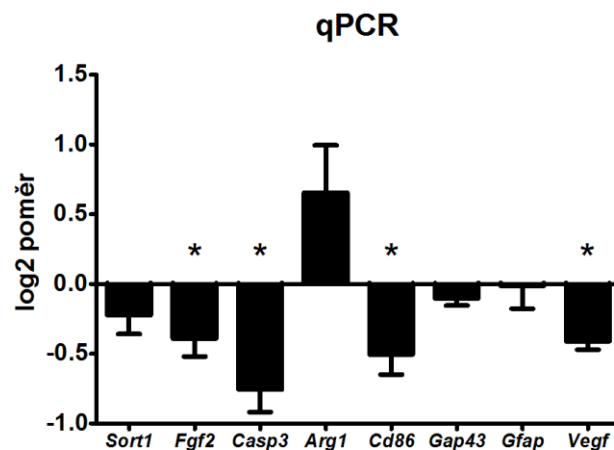
Polarizaci mikroglíí/makrofágů do M2 fenotypu jsme určovali barvením transverzálních řezů dvěma protilátkami anti-CD68 (červená) a anti-CD206 (zelená). CD68 je společný marker mikroglíí/makrofágů a M2 makrofágy byly definovány jako dvojité pozitivní CD68+/CD206+ buňky a jejich počet byl vztažen na mm². Analýza byla provedena v kraniiální (-2mm), centrální a kaudální (+2mm) části míchy. U laserem léčené skupiny bylo nalezeno statisticky signifikantně více CD68+/CD206+ buněk v kraniiální a centrální části míchy (Obrázek 15).



Obrázek 15. Polarizace mikroglíí/makrofágů do M2 fenotypu. (A, B) Repräsentativní obrázky CD206 (zelená) a CD68 (červená) barvení (A) – laser, (B) – kontrola. (C) Hodnocení počtu dvojité pozitivních buněk v kraniiální (-2 mm), centrální a kaudální (+ 2 mm) části míšné léze. V grafch jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. n=4. *p<0.05.

4.1.6 qRT-PCR

Pomocí kvantitativní PCR v reálném čase byla hodnocena exprese genů pro růstové faktory (*Sort1*, *Fgf2*), apoptózu (*Casp3*), imunitní odpověď (*Arg1*, *Cd86*), růst axonálních kolaterál (*Gap43*), astrogliózu (*Gfap*) a vaskularizaci (*Vegf*) (Obrázek 16). Exprese všech zkoumaných genů byla u laserem léčené skupiny snížena s výjimkou *Arg1*, jehož exprese byla zvýšena, ale nedosáhla significance. Signifikantní snížení exprese bylo naopak pozorováno u genů *Fgf2*, *Casp3*, *Cd86* a *Vegf* v porovnání s kontrolní skupinou.



Obrázek 16. Vliv laserové terapie na úroveň mRNA genů spojených s regenerativním procesem. Hodnoty jsou vztaženy vůči kontrolní skupině. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. $n=4$. * $p<0.05$.

4.2 Vliv polyfenolu ze zeleného čaje EGCG a kurkuminu na regeneraci po MP

Výsledky v této kapitole jsou založeny na datech z článků:

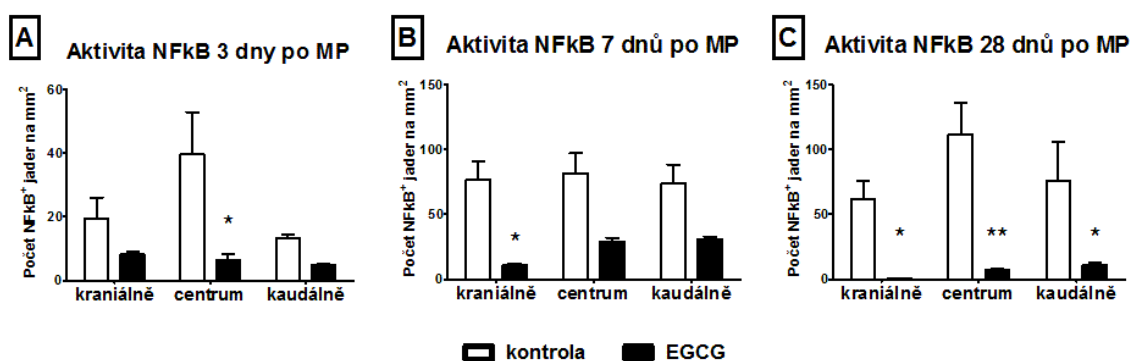
Machova Urdzikova, L.; Ruzicka, J.; Karova, K.; Kloudova, A.; Svobodova, B.; Amin, A.; Dubisova, J.; Schmidt, M.; Kubinova, S.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P. A green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances neuroregeneration after spinal cord injury by altering levels of inflammatory cytokines. *Neuropharmacology*. 2017 Nov;126:213-223.

Ruzicka, J.; Urdzikova, L.M.; Svobodova, B.; Amin, A.G.; Karova, K.; Dubisova, J.; Zavislova, K.; Kubinova, S.; Schmidt, M.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P. Does combined therapy of curcumin and epigallocatechin gallate have a synergistic neuroprotective effect against spinal cord injury? *Neural Regen Res*. 2018 Jan;13(1):119-127.

V těchto publikacích jsme se zabývali terapeutickým potenciálem extraktu ze zeleného čaje EGCG a jeho případnou synergií s kurkuminem, jehož protizánětlivé vlastnosti byly popsány v dřívějších publikacích (Machova Urdzikova et al., 2015). Nejprve jsme zkoumali vliv EGCG na aktivitu NFκB dráhy a cytokinů spojených se zánětem, a poté vliv samotného EGCG, kurkuminu a jejich kombinace na funkční testy a patofyziologii po MP.

4.2.1 Aktivita dráhy NFκB

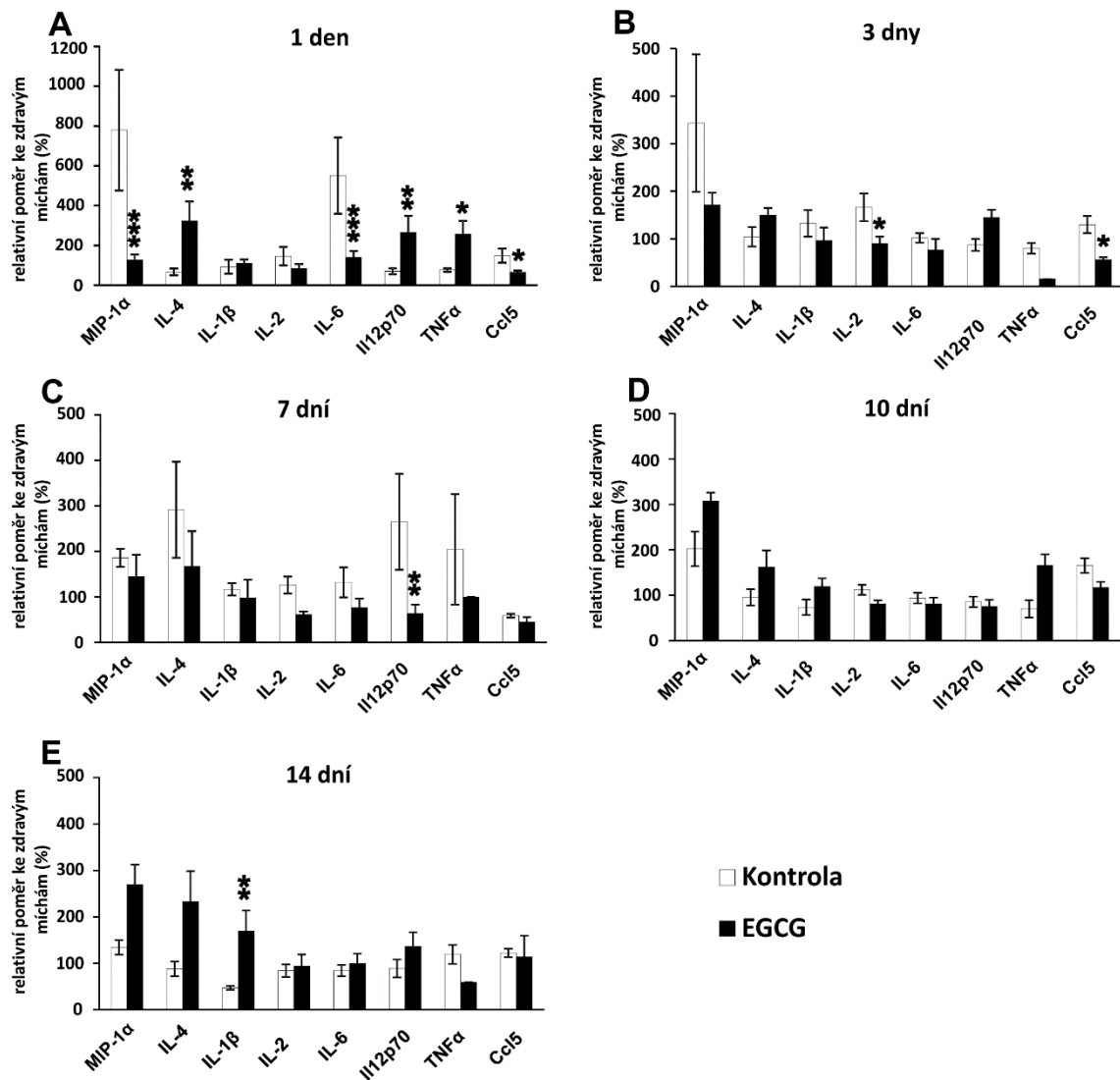
Sledovali jsme vliv EGCG na aktivitu prozánětlivé dráhy NFκB. Hodnotili jsme počet p65 pozitivních jader na mm² tkáně 3., 7. a 28. den po MP (Obrázek 17 – A – C). Léčba EGCG vedla k výraznému poklesu aktivity NFκB dráhy ve všech sledovaných časových úsecích v porovnání s kontrolní skupinou. Počet p65 pozitivních jader 3 dny po MP byl signifikantně snížen v centru léze, 7 dní po MP bylo pozitivních jader výrazně méně kraniálně od centra léze a 28. den byla aktivita p65 spojená s NFκB dráhou signifikantně snížena ve všech hodnocených oblastech léze.



Obrázek 17. Aktivita NFkB. Vliv EGCG na NFkB signalizační dráhu 3, 7 a 28 dní po MP. n=12. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2.2 Hladiny cytokinů

Sledovali jsme vliv EGCG na hladinu sekretovaných zánětlivých cytokinů 1, 3, 7, 10 a 14 dní po MP v kontrolní i EGCG léčené skupině (Obrázek 18). Nejvyšší efekt léčby EGCG byl zaznamenán první den po MP. Hladiny cytokinů MIP1 α , IL6 a CCL5 byly signifikantně sníženy a jejich hodnoty byly stabilní v průběhu celého týdne. Hladina IL4 byla u EGCG skupiny zvýšena, signifikantně však pouze 1. den po MP. Celková zánětlivá reakce klesala v průběhu času. Hladina IL2 byla v EGCG léčené skupině signifikantně snížena 3 dny po MP. Hladiny cytokinů IL12p70 a TNF α po počátečním signifikantním zvýšení začaly klesat během prvního týdne léčby, avšak hladina těchto cytokinů u kontrolní skupiny projevovала opačný trend. Hladina IL1 β byla u EGCG léčené skupiny signifikantně vyšší 14 dní po MP v porovnání s kontrolní skupinou zvířat.



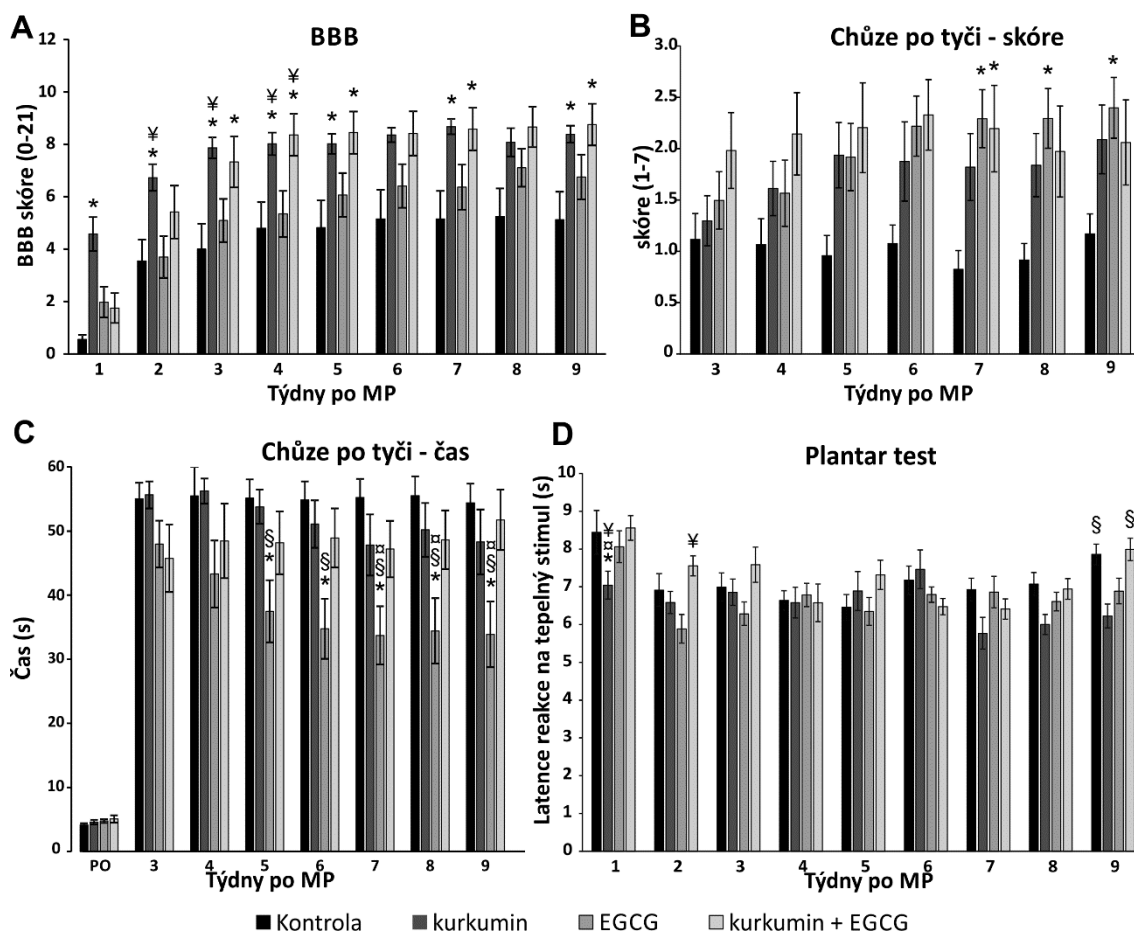
Obrázek 18. Hladiny sekretovaných cytokinů spojených se zánětlivou reakcí stanovované v místě léze. Hodnoty jsou vztaženy vůči hodnotám naměřeným ve zdravé míše. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. $n=5$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

4.2.3 Motorika a senzitivita zadních končetin

Zhodnocení zlepšení motorických a senzoryckých funkcí po MP bylo opět provedeno sérií testů. Porovnávali jsme skupiny zvířat z kontrolní skupiny, léčené samotným kurkuminem, EGCG nebo jejich kombinací. Kontrolní skupina dosáhla v BBB testu plató fáze po 4 týdnech od MP a průběrné hodnoty méně než 6 bodů. Skupina léčená EGCG prokázala pouze mírné zlepšení motorických funkcí, avšak zvířata léčená samotným kurkuminem nebo kombinací kurkuminu a EGCG se v porovnání s kontrolní skupinou výrazně zlepšila (Obrázek 19 – A).

Během testu chůze po tyči (Obrázek 19 – B a C), který vyžaduje složitější motorické dovednosti, dosáhla kontrolní skupina zvířat průměrného bodového hodnocení 1, což představuje udržení se na tyči po dobu nejméně 30 vteřin bez schopnosti tyč přejít. Všechny léčené skupiny zvířat získaly více než 2 body, což představuje schopnost dojít alespoň do poloviny délky tyče. Zvířata léčená EGCG dosáhla nejlepšího výsledku ze všech skupin. V prvních týdnech měla skupina s kombinovanou léčbou lepší výsledky než jednotlivé léčby a kontrolní skupina, avšak tento trend nebyl signifikantní. Dalším měřeným parametrem byl čas potřebný k přejití tyče. Nejkratší čas měla skupina dostávající EGCG léčbu. Skupiny léčené jednotlivými látkami byly signifikantně rychlejší než kontrolní zvířata, synergický efekt kombinované léčby však nebyl v tomto případě pozorován.

Míru hyperalgesie po MP a léčbě jsme testovali plantar testem (Obrázek 19 - D). EGCG, kurkumin, ani jejich kombinace neměly vliv na hyperalgesii vzniklou následkem MP.



Obrázek 19. Výsledky behaviorálního testování po léčbě kurkuminem, EGCG a jejich kombinací. (A) Hodnocení lokomočních dovedností pomocí BBB testu. (B, C) Výsledky hodnocení komplexních motorických schopností pomocí testu chůze na tyči. (D) Vliv terapie na termální nocicepci sledovaný plantar testem. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. Kontrolní skupina n=10, EGCG skupina n=19, kurkumin skupina n=13, kurkumin+EGCG skupina n=9. *p<0.05 vůči kontrole, § p<0.05 vůči skupině kurkumin, ¥ p<0.05 vůči skupině EGCG, ¤ p<0.05 vůči skupině EGCG a kurkumin. PO – před operací.

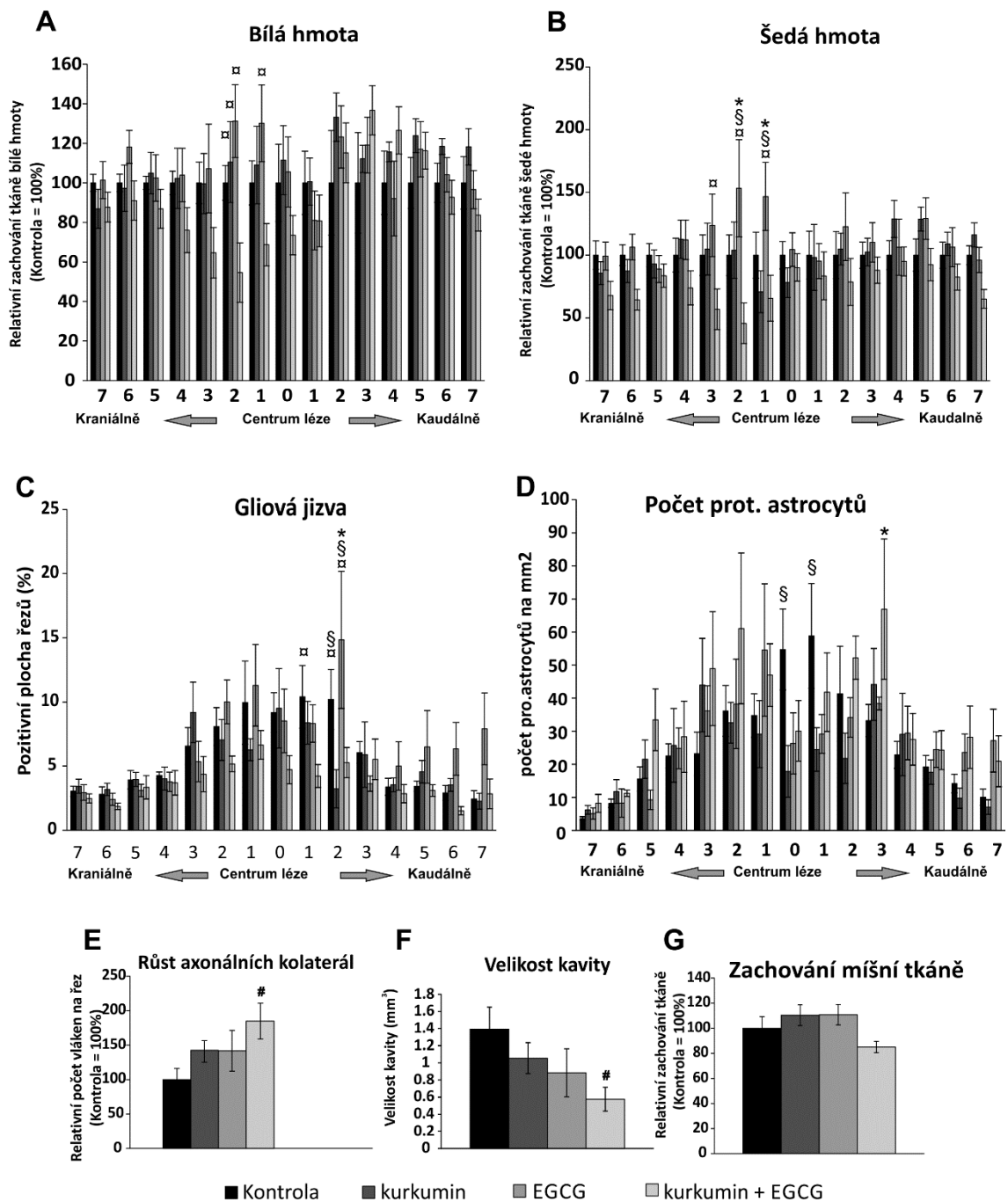
4.2.4 Histologická a imunohistochemická analýza 9 týdnů po MP

Morfometrickou analýzou jsme porovnávali efekt EGCG, kurkuminu a jejich kombinace na zachování šedé a bílé hmoty (Obrázek 20 – A a B). Žádná ze sledovaných terapií neprokázala signifikantní vliv na zachování míšní tkáně. Samostatná aplikace EGCG a kurkuminu měla pouze mírný vliv na zachování míšní tkáně, jejich kombinace však neměla efekt žádný. Naopak kombinovaná léčbajevila silný trend snížení velikosti míšní kavity v porovnání s kontrolní skupinou (Obrázek 20 – F).

Velikost gliové jizvy nebyla samostatnými léčbami nijak signifikantně snížena, avšak v obou skupinách byl nalezen menší počet protoplazmatických astrocytů (Obrázek

20 – C a D). Kombinovaná terapie ukázala částečné snížení GFAP pozitivní zjizvené tkáně ve střední části poškozené míchy v porovnání s kontrolní skupinou. V této skupině nebyl změněn počet protoplazmatických astrocytů.

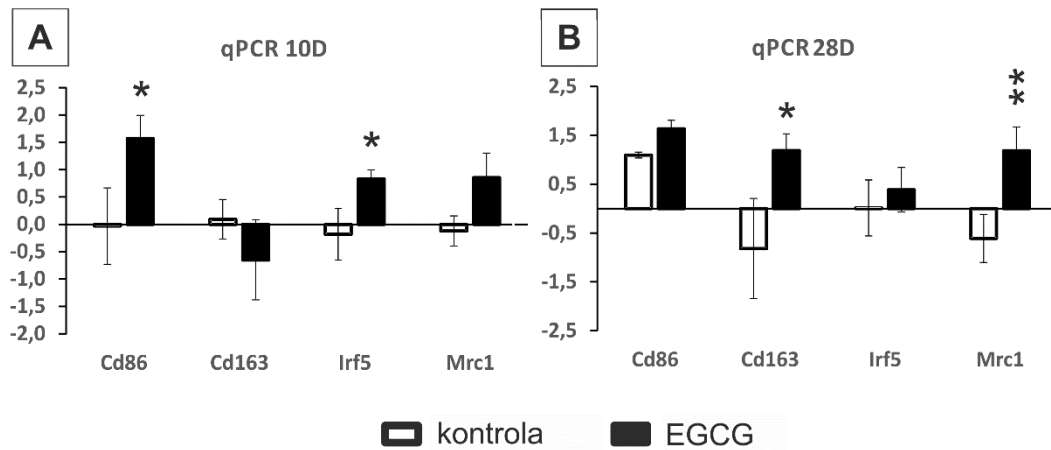
Počet nově rostoucích axonů byl měřen na řadě transverzálních řezů nabarvených na GAP43 (Obrázek 20 – E). Obě samostatné léčby měly tendenci zvýšit počet GAP43 pozitivních vláken, kombinovaná terapie měla tento efekt ještě výraznější až na hranici signifikance ($p=0.057$).



Obrázek 20. Výsledky histologické a imunohistochemické analýzy poraněné míchy 9 týdnů po MP. Hodnotili jsme zachování bílé a šedé hmoty (A, B) na řezech barvených Luxol-Fast Blue a kresolovou violetí, plochu gliové jizvy (C) a počet protoplazmatických astrocytů (D) pomocí barvení proti GFAP a růst axonálních kolaterál (E) na řezech nabarvených proti GAP43. Morfometrickou analýzou jsme stanovovali velikost kavity (F) a celkové zachování míšní tkáně (G). V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. $n=5$. * $p<0.05$ vůči kontrole, § $p<0.05$ vůči skupině kurkumin, α $p<0.05$ vůči skupině EGCG a kurkumin. Symbol # je použit pro znázornění trendu se statistickou hodnotou $p = 0.05 - 0.06$.

4.2.5 qPCR

V míchách zvířat léčených EGCG jsme nejprve stanovovali expresi genů spojených s makrofágy (*Cd86*, *Cd163*, *Irf5* a *Mrc1*) v 10. a 28. dni po MP (Obrázek 21). EGCG má vliv na expresi genů markerů M1 a M2 makrofágů. 10. den po MP byla zvýšena exprese markerů *Cd86* a *Irf5* a 28. den po MP byla signifikantně zvýšena exprese markerů *Cd163* a *Mrc1* u skupiny léčené EGCG.



Obrázek 21. Analýza genové exprese. Výsledky analýzy genů markerů mikroglíí/makrofágů 10 (A) a 28 (B) dní po MP. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty $\Delta\Delta Ct \pm SEM$. $n=5$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3 Vliv nanokurkuminu na regeneraci po MP

Výsledky v této kapitole jsou založeny na datech z článku:

Krupa, P.; Svobodova, B.; Dubisova, J.; Kubinova, S.; Jendelova, P.; Urdzikova, L.M. Nano-formulated Curcumin (Lipodisq(TM)) modulates the local inflammatory response, reduces glial scar and preserves the white matter after spinal cord injury in rats. *Neuropharmacology*. 2019 May 17.

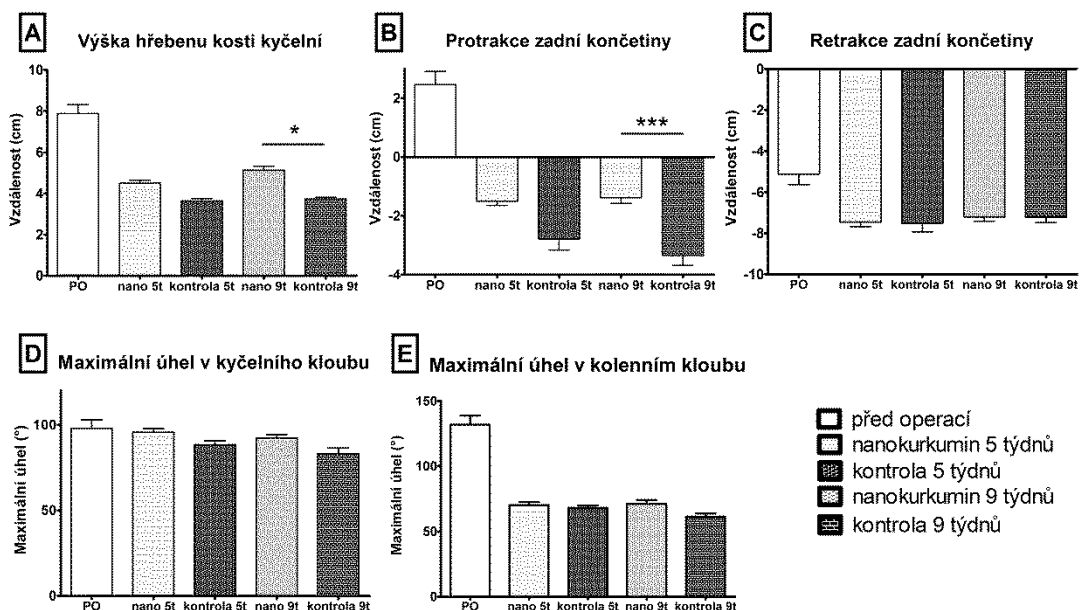
Pro tuto naši studii jsme použili vysoce purifikovaný syntetický kurkumin bez příměsí, které jsou běžně obsaženy v extraktech z kurkumy (demethoxy- a bis-demethoxykurkumin) a zbavený 30 – 40% nečistot nacházejících se v jiných kurkuminových preparátech. Námi použitý vysoce čistý kurkumin byl navázán na Lipodisq™, což je diskoidní nanočástice s průměrem typicky 10-25 nm, které jsou biodegradabilní a jsou schopné inkorporovat hydrofobní a ve vodě špatně rozpustné sloučeniny. Tento nanokurkumin je na rozdíl od běžného kurkuminu rozpustný ve vodě a fyziologických roztocích.

4.3.1 Motorika a senzitivita zadních končetin

Vliv nanokurkuminu na obnovu lokomočních funkcí zadních končetin byl sledován pomocí BBB testu od prvního týdne po MP a od třetího týdne testu chůze po tyči. První den po MP byla zvířata kontrolní i léčené skupiny paraplegická s bodovým hodnocením 0-1. Obě skupiny se v průběhu experimentu zlepšovaly, ale nebyl mezi nimi zaznamenán rozdíl.

Pro detailnější a objektivnější hodnocení behaviorálního efektu léčby byla použita analýza videozáznamu pohybu potkana 5. a 9. týden po MP. Hodnotili jsme výšku HKK a protrakci a retrakci zadních končetin. 5 týdnů po MP nebyl mezi skupinami rozdíl, avšak v 9. týdnu dosahovala signifikantně lepších výsledků skupina léčená nanokurkuminem v parametru výška HKK a protrakce zadních končetin (Obrázek 22 – A, B).

Dále jsme sledovali rozsah pohybu v kyčelním a kolenním kloubu zadních končetin (Obrázek 22 – D, E), kde nebyl nalezen rozdíl mezi léčenou a kontrolní skupinou zvířat. Ve všech měřených parametrech byla skupina léčená nanokurkuminem blíže k hodnotám zdravých zvířat.



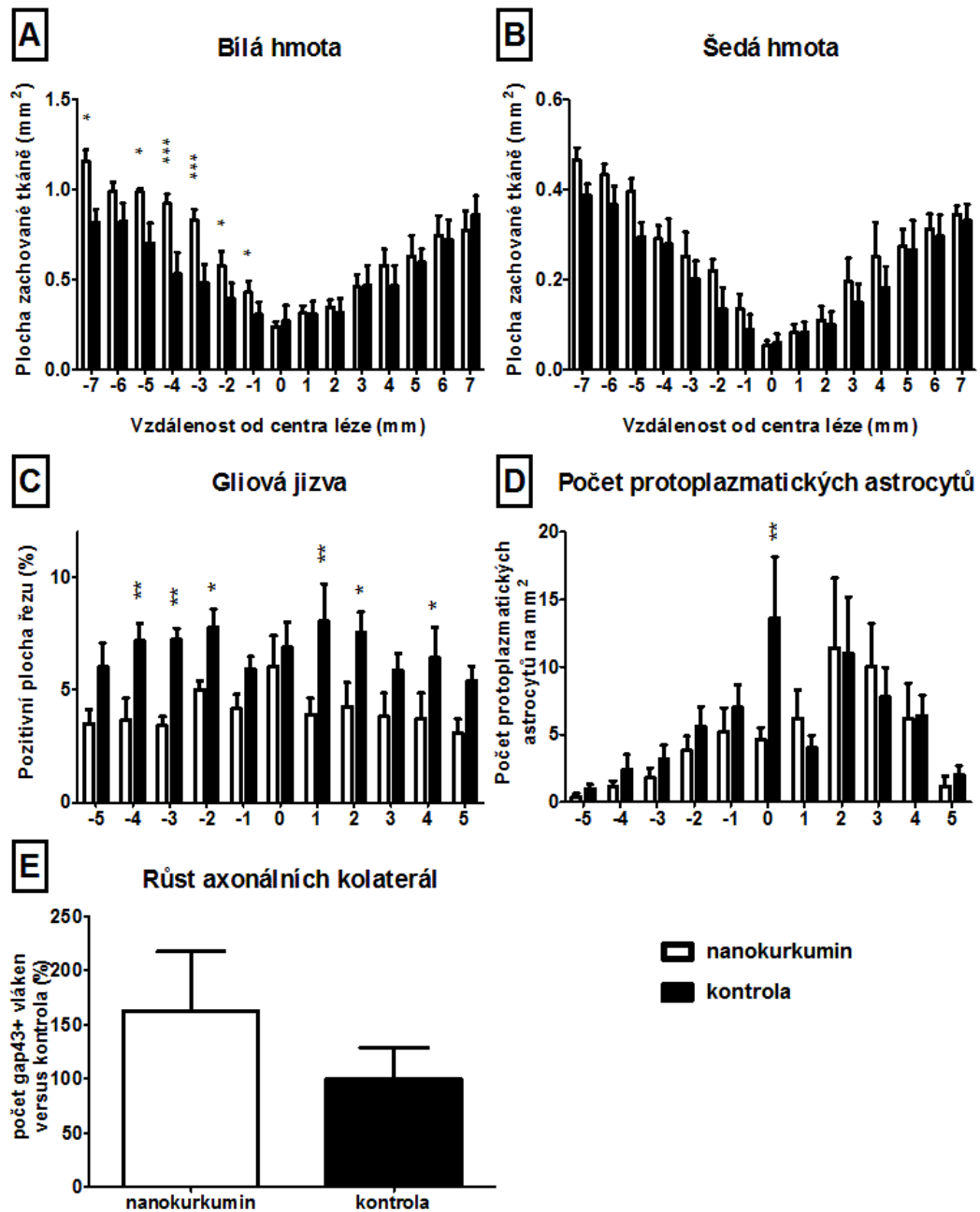
Obrázek 22. Kvantitativní analýza pohybu 5 a 9 týdnů po MP. (A) Výška HKK byla definována jako vertikální vzdálenost mezi podlahou a HKK. (B) Pozitivní maximální horizontální vzdálenost (protrakce) metatarzofalangeálního kloubu a hřebenu kosti kyčelní. (C) Negativní maximální horizontální vzdálenost (retrakce) metatarzofalangeálního kloubu a hřebenu kosti kyčelní. (D, E) Rozsah pohybu v kyčelním a kolenním kloubu. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. $n=5$. * $p<0.05$, *** $p<0.001$. PO – před operací.

4.3.2 Histologická a imunohistochemická analýza 9 týdnů po MP

Zachování šedé a bílé hmoty míšni bylo hodnoceno morfometrickým měřením, při kterém jsme pozorovali signifikantní rozdíl jen u zachované bílé hmoty na většině řezů kraniálně od centra léze u zvířat po aplikaci nanokurkuminu (Obrázek 23 - A). V šedé hmotě jsme pozorovali pouze pozitivní trend.

Vznik gliální jizvy byl hodnocen jako plocha GFAP pozitivní astrogliální tkáň okolo hlavní kavity. Plocha gliové jizvy byla signifikantně snížena u skupiny léčené nanokurkuminem v porovnání s kontrolní skupinou (Obrázek 23 - C). Větší počet protoplazmatických astrocytů byl nalezen především v kraniální části léze u kontrolní skupiny, signifikantně byl pak zvýšen v centru léze u kontrolní skupiny oproti skupině léčené nanokurkuminem (Obrázek 23 - D).

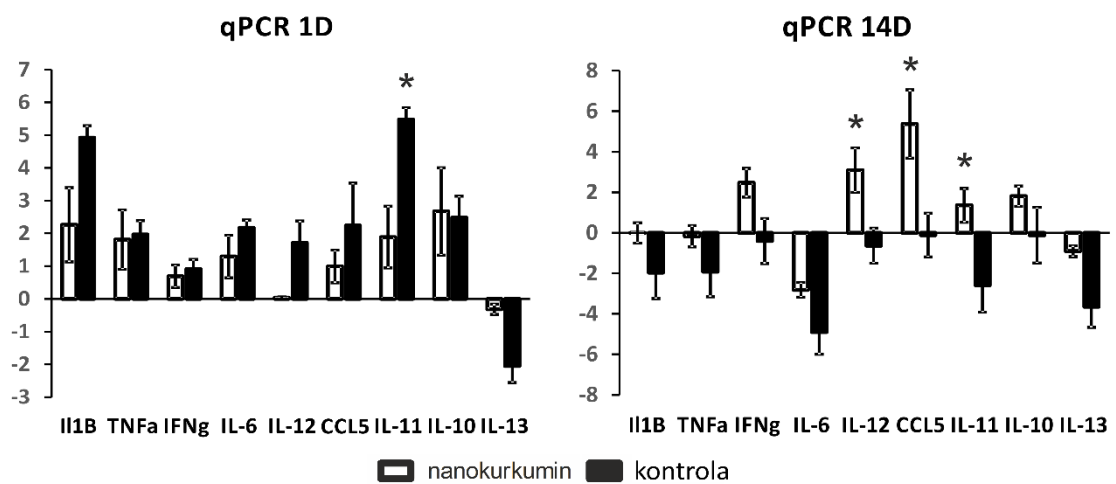
Nově vzniklá axonální vlákna byla hodnocena jako celková plocha GAP43 pozitivních vláken na transversálních řezech míchy. U zvířat léčených nanokurkuminem jsme pozorovali mírné zvýšení (Obrázek 23 – E).



Obrázek 23. Histologická a imunohistochemická analýza 9 týdnů po MP. Hodnotili jsme zachování bílé a šedé hmoty (A, B) na řezech barvených Luxol-Fast Blue a kresolovou violetí, plochu gliové jizvy (C) a počet protoplazmatických astrocytů (D) pomocí barvení proti GFAP a růst axonálních kolaterál (E) na řezech nabarvených proti GAP43. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. n=5. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.3.3 qPCR

1 den a 14 dní po MP jsme sledovali expresi vybraných genů pro zánětlivé cytokiny *Il1b*, *Tnfa*, *Ifny*, *Il6*, *Il12*, *Ccl5*, *Il11*, *Il10* a *Il13* (Obrázek 24). Hodnoty v grafu jsou vztaženy vůči zdravé skupině zvířat. Jeden den po MP byla u skupiny léčené nanokurkuminem zjištěna snížená exprese genu pro *Il11* a silný trend ke snížení *Il1b* v porovnání s neléčenou kontrolou. 14 dní po MP bylo u skupiny léčené nanokurkuminem pozorováno signifikantní zvýšení exprese *Ccl5*, *Il11* a *Il12* a silný trend zvýšení exprese *Il6* a *Il13*.



Obrázek 24. mRNA exprese vybraných genů pro zánětlivé cytokiny 1 a 14 dní po MP. V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm SEM. n=5. *p<0.05.

5 DISKUSE

Poranění míchy není možné v současné době účinně léčit. Protože se jedná o závažný traumatický stav s vážnými a trvalými následky, je pátrání po efektivní léčbě velmi intenzivní. Zároveň je snaha najít efektivní léčbu velkou výzvou a trvá po celá staletí, proto je žádoucí i nalezení léčby, která by alespoň zmírnila následky primárního a sekundárního poranění.

U všech vybraných článků byl použit experimentální model MP vytvořený balónkovou kompresní lézí. Jedná se o jednoduchý a replikovatelný model, který je klinicky relevantní k lidskému MP. Míšní obaly zůstávají nepoškozeny. V místě poranění není páteřní kanál narušen laminektomií, jako je tomu u jiných modelů, takže nedochází k ovlivnění sekundární fáze poranění dekompresí (Vanicky et al., 2001).

5.1 Vliv laserového světla o vlnové délce 808 a 905 nm na regeneraci po MP

V první studii jsme hodnotili vliv FBM na zmírnění následků MP. Pro léčbu jsme použili komerčně dostupný MLS laser, jehož pulzy jsou založeny na kombinaci a synchronizaci dvou vlnových délek: 808 a 905 nm. Tato kombinace by měla vylepšit průnik světelné energie do tkáně a být tudíž více efektivní v modulaci buněčného metabolismu a krevního zásobení. Bylo prokázáno, že obě vlnové délky mohou procházet všemi anatomickými vrstvami nad míchou. Byrnes a spol. ukázali, že 6 % energie laserového světla o vlnové délce 810 nm může míchou projít (Byrnes et al., 2005).

Naše data ukazují funkční zlepšení po léčbě FBM. Došlo k signifikantnímu zvýšení BBB skóre, pomocí kterého jsme sledovali lokomoci od prvního týdne po MP. Již hned od počátku testování byla skupina léčená FBM lepší. Zlepšení motoriky bylo pozorováno i v dalších publikacích (Byrnes et al., 2005; Wu et al., 2009; Paula et al., 2014). BBB test je velmi užitečný pro hodnocení celkového pohybu potkana po volném prostranství, avšak příliš nereflektuje specifické a drobné změny v motorických funkcích (Burke and Magnuson, 2012). Z tohoto důvodu jsme do experimentu zařadili test chůze po tyči, který vyžaduje přesnější koordinaci pohybu a větší sílu zadních končetin. Laserem léčená skupina potkanů byla schopna přejít tyč za kratší čas a získala vyšší bodové ohodnocení. Tento test lze svou náročností srovnávat s chůzí po žebříku, který použil i Byrnes a spol.,

kde pozorovali u skupiny léčené FBM po dorzální hemisekci zkrácení času potřebného k přejití žebříku (Byrnes et al., 2005).

Funkční zlepšení motorických schopností po FBM bylo potvrzeno i kvantitativní analýzou videozáznamu pohybu. Skupina léčená laserem byla blíže skupině zdravých zvířat v parametrech výška HKK, protrakce zadních končetin a rozsah pohybu v kyčelním kloubu. Rozsah pohybu v kotníku byl u skupiny léčené FBM překvapivě vyšší v porovnání s kontrolní i zdravou skupinou. Toto zvýšení může vzniknout jako kompenzační mechanismus k efektivnímu pohybu v průběhu rekonvalescence.

Vliv FBM na senzorycké funkce jsme sledovali použitím plantar testu, který u léčených zvířat ukázal pokles poraněním vyvolané hypersenzitivity. Tento efekt pozorovaly i další studie. Hu a spol. popsali zmírnění hypersenzitivity po FBM léčbě 670 nm LED světlem po hemikontuzním poranění (Hu et al., 2016). Rovněž Veronez a spol. při ozáření poraněné míchy světlem o energii 1000 J/cm² pozorovali zlepšenou taktilní sensitivitu (Veronez et al., 2016).

Výsledky histologické analýzy korelují s pozorovaným zlepšením motorických i senzoryckých funkcí. Domníváme se, že FBM má neuroprotektivní efekt. Ve skupině léčené laserem jsme našli v periferních částech signifikantně více zachovanou šedou i bílou míšňí tkáň. K podobným výsledkům dospěli i Paula a spol., kteří nervovou tkáň analyzovali 20 dní po MP (Paula et al., 2014). Neuroprotektivní efekt FBM je také podpořen *in vitro* studií, ve které Wong-Riley a spol. ukázali, že LED světlo snižuje smrt primárních neuronů díky podpoře funkce mitochondriálního enzymu CCO (Wong-Riley et al., 2005).

Byrnes a spol. sledovali pozitivní vliv světla o vlnové délce 810 nm a energetické dávce 1 589 J/cm² na regeneraci axonů (Byrnes et al., 2005). Totéž ukázal i výzkum Wu a spol., ve kterém použili stejný laser jako Byrnes a spol. a ke sledování regenerace axonů využili anterográdní značení axonů v míše po hemisekci a kontuzi (Wu et al., 2009). Naše výsledky nepotvrzují vliv FBM na axonální růst, nepozorovali jsme rozdíl v množství GAP43+ vláken. Rovněž výsledky analýzy genové exprese neukazují žádný rozdíl v gap43 mRNA 9 týdnů po MP.

Aplikace FBM neovlivnila tvorbu gliové jizvy. Rozdíl byl však nalezen v počtu protoplazmatických astrocytů, ve skupině léčené laserem byl jejich počet v kaudální části

míchy signifikantně nižší. Protektivní efekt FBM na kaudální část poškozené míchy byl rovněž popsán v práci Song a spol., která navíc poukazuje na zvýšené množství protizánětlivých M2 mikroglíí/makrofágů po léčbě laserem (Song et al., 2017). Von Leden a spol. zkoumali polarizaci mikroglíí/makrofágů po různé dávce světelné energie. Hodnoty mezi 0,2 - 10 J/cm² indukovaly polarizaci do M2 fenotypu (von Leden et al., 2013). Výsledky analýzy genové exprese naznačují stejný trend polarizačního posunu směrem k M2 mikroglíím/makrofágům. Po léčbě došlo k signifikantnímu snížení mRNA genu *Cd86* (marker prozánětlivých M1) a k mírnému zvýšení mRNA *Arg1* (marker M2). Celková aktivace mikroglíí/makrofágů byla u léčené i neléčené skupiny dle imunohistochemické analýzy podobná. Pro rozlišení M2 mikroglíí/makrofágů bylo použito dvojité barvení CD206 a CD68 a dvojité pozitivní buňky byly považovány za M2 fenotyp. Jejich počet byl signifikantně zvýšen v kraniální a centrální části poraněné míchy, což podporuje hypotézu Songa a spol. o mechanismu působení FBM rovněž přes vliv na polarizaci mikroglíí/makrofágů (Song et al., 2017).

Analýzou genové exprese jsme odhalili snížení exprese genů *Sort1*, *Fgf2*, *Casp3* a *Vegf*. Sortilin je membránový receptor exprimovaný nervovou tkání, na který se váže NGF a jeho prekurzor proNGF. Tyto neurotrofiny regulují neuronální vývoj signálními dráhami buněčné smrti. Neuronální buňky po poranění sekretují prekurzor, který indukuje apoptózu navázáním na sortilinový receptor (Jansen et al., 2007). Hladina mRNA genu *Sort1* byla u laserem léčené skupiny mírně snížena. Sortilinový ligand NGF je takové spojován se vznikem hyperalgesie (Shu and Mendell, 1999), proto snížená hladina mRNA *Sort1* genu může souviset s poklesem tepelné hypersensitivitivy u laserem léčené skupiny.

Další námi sledovaný gen *Casp3* může souviset s apoptózou, ale k jeho upregulaci dochází i v reaktivních astrocytech bez přítomnosti buněčné smrti (Aras et al., 2012). Námi pozorované snížení *Casp3* může souviset se snížením počtu protoplazmatických astrocytů po FBM léčbě.

Hladina VEGF se po MP snižuje a tento pokles přetrvává až 1 měsíc po poranění (Herrera et al., 2009). Neutralizace VEGF pomocí protilátek se projeví zpomalením funkční regenerace a zhoršením histopatologie funkční regenerace (Benton et al., 2009). Snížení toho faktoru může být spojeno s již zmiňovaným poklesem hypersenzitivitivy po

MP, výsledky studie od Nesic a spol. naznačují, že VEGF-A izoforma 165 u potkanů po MP zvyšuje hypersenzitivitu a mechanickou alodynii (Nesic et al., 2010).

Yoshida et al. ukázal, že intratékální aplikace FGF-2 protilátky potkanům s neuropatickou bolestí snižuje hladiny FGF-2 a množství GFAP pozitivních buněk a signifikantně zeslabuje mechanickou alodynii (Yoshida et al., 1992). My jsme v naší studii po FBM našli sníženou hladinu genové exprese Fgf-2, což může souviset s pozorovanou signifikantní redukcí hyperalgezie, stejně jako s nižším počtem protoplazmatických astrocytů v kaudální části poškozené míchy.

FBM je neinvazivní terapeutická metoda. Je zřejmé, že nastavení parametrů, jako jsou intenzita nebo frekvence světelného paprsku, jsou důležité. V publikacích se tyto parametry velmi liší a rozsah použitých energetických dávek se pohybuje mezi 6 J/cm² (Paula et al., 2014) a 1,500 J/cm² (Wu et al., 2012b). Je proto velmi složité mezi sebou výsledky jednotlivých studií porovnávat, pokud jde o nastavené parametry. Naše studie se zabývala dlouhodobým vlivem kombinace dvou vlnových délek na funkční zlepšení po MP. K odhalení mechanismu účinku FBM vedoucího k námi pozorovaným pozitivní změnám, je zapotřebí hlubší biochemické analýzy, především v časných úsecích po MP. Přesto jsme prokázali pozitivní terapeutický efekt na akutní MP využitím kombinace dvou vlnových délek emitovaných z komerčně dostupného laserového přístroje. Tyto výsledky poukazují na nadějný terapeutický potenciál FBM pro léčbu lidí s MP.

5.2 Vliv EGCG, kurkuminu, jejich kombinace a nanokurkuminu na regeneraci po MP

V dalších dvou publikacích jsme se zaměřili na efekt přírodních sloučenin EGCG a kurkuminu na zmírnění následků po MP. Třetí publikace se zabývá také kurkuminem, avšak jeho modifikovanou formou, která je navázána na nanonosič, který má za cíl upravit vlastnosti zmiňované molekuly, aby byla lépe rozpustná a v těle lépe dostupná. I přes množství pozitivních výsledků studií není kurkumin příliš směřován do klinické praxe, především kvůli jeho rychlé metabolizaci, nízké rozpustnosti ve vodě a rychlé eliminaci (Metzler et al., 2013; Tonnesen, 2002). Současný pokrok v nanomedicině umožňuje navazovat léčivé molekuly na vhodné nanonociče, což může zvýšit jejich biologickou dostupnost. To bylo zkoušeno i s molekulou kurkuminu, která byla navázána na chemických polymerech (Liu et al., 2019), byla zavzata do lipozomů (Jelezova et al., 2015) a polymerických mycel (Yoncheva et al., 2015). Kurkumin navázaný na nanočásticích má lepší biologickou dostupnost díky jeho vyšší koncentraci v plazmě (Cheng et al., 2013; Umerska et al., 2018). Má silný imunomodulační efekt (Trivedi et al., 2017) a působí více protektivně proti neurodegenerativním změnám než běžný kurkumin (Dende et al., 2017).

U kurkuminu byl již dříve popsán jeho vliv na snížení aktivity dráhy NFκB (Machova Urdzikova et al., 2015). Zvýšená aktivace této dráhy bývá spojována se zánětlivou reakcí a zahrnuje několik cytokinů, chemokinů, enzymů, adhezních molekul a kináz (Aggarwal and Harikumar, 2009; Begum et al., 2008; Chainani-Wu, 2003). NFκB signální dráha a její aktivace je jednou z nejdůležitějších faktorů v patofyziologii zánětu vznikajícího po MP (Bethea et al., 1998). NFκB je prozánětlivý modulátor a může být aktivován oxidativním stresem a cytokiny uvolněnými po primárním poškození při MP (Chen et al., 1999). NFκB reguluje promotery několika zánětlivých cytokinů včetně interleukinů a TNFα, které následně aktivují další NFκB faktory a tento okruh aktivace je zvětšuje a zhoršuje poškození nervové tkáně po MP (Moon et al., 2009). Naše EGCG studie ukázala, že rovněž tato látka snižuje aktivitu NFκB dráhy spolu se snížením hladiny CCL5, IL2, IL6, MIP1α a IL12 během prvního týdne po MP. Ke snížení IL2, MIP1α a IL12 došlo i po podání kurkuminu, který navíc snižoval i hladinu TNFα (Machova Urdzikova et al., 2015).

TNF α je hlavním mediátorem při většině zánětlivých onemocnění. Také EGCG má na jeho hladiny vliv, nejprve dochází k počátečnímu vzestupu 1 den po MP s následným poklesem, který přetrvává až do 14. dne, pouze 10. den bylo pozorováno nesignifikantní zvýšení. Podobných výsledků dosáhl Alvarez-Perez a spol., v jejichž studii byla hladina tohoto proteinu snížena 7 a 14 dní po kontuzi míchy (Alvarez-Perez et al., 2016). Xifro a spol. našli sníženou hladinu TNF α 14 dní po MP, avšak žádný rozdíl mezi EGCG léčenou a neléčenou skupinou 56 dní po MP (Xifro et al., 2015).

U studie léčebného potenciálu nanokurkuminu jsme stanovovali hladinu mRNA zánětlivých cytokinů v místě léze 24 hodin po MP. Pozorovali jsme signifikantní snížení hladiny mRNA *Il11*, silný trend k poklesu prozánětlivého cytokinu *Il1 β* a mírné snížení dalších prozánětlivých cytokinů jako *Tnf α* , *Il6*, *Ifn γ* a *Ccl5*. IL11 má více funkcí, především je regulatorním cytokinem zánětlivé reakce. V akutní fázi po poranění je sekretován hlavně reaktivními astrocyty s vrcholem genové exprese 24 hodin po MP (Cho et al., 2012; Zhang et al., 2006). IL1 β je rovněž důležitý prozánětlivý cytokin hrající hlavní roli v zánětlivém procesu v poraněné míše (Pineau and Lacroix, 2007; Sato et al., 2012). Nanokurkumin potlačil aktivaci reaktivních astrocytů, což by mohlo vysvětlit snížení exprese *Il11* a *Il1 β* . Snížení *Ifn γ* koreluje se snížením jeho induktoru *Il12* (Cavaillon, 2001). Dále jsme pozorovali mírné nesignifikantní zvýšení protizánětlivých cytokinů *Il10* a *Il13*.

Ve skupině léčené nanokurkuminem jsme sledovali genovou expresi vybraných cytokinů ještě 14 dní po MP. Protizánětlivé cytokiny *Il10* a *Il13* byly mírně zvýšeny oproti kontrolní skupině. Nastala signifikantní upregulace *Il12*, což koreluje s mírnou upregulací *Ifn γ* . Avšak několik studií ukazuje, že hladinu cytokinu IL12 zvyšuje nejen zvýšená exprese IFN γ , ale také protizánětlivý IL10 (Gerosa et al., 1996; Jeannin et al., 1996; Meyaard et al., 1996). Protizánětlivé a regenerativní působení IL12 po MP bylo pozorováno Yaguchi a spol., který ukázal sníženou tvorbu gliové jizvy, více myelinizovaných axonů a zlepšení motorických funkcí zvířat po MP po aplikaci IL12 (Yaguchi et al., 2008). V naší dřívější studii (Machova Urdzikova et al., 2015), jsme po léčbě kurkuminem také našli zvýšenou hladinu cytokinu IL12 14 dní po MP. Další změnou v čase po léčbě nanokurkuminem byla zvýšená exprese *Ccl5* 14 dní po MP. Navzdory důkazům o neurodegenerativním vlivu zvýšeného CCL5 v T-lymfocytech po MP existují také studie ukazující jeho

neuroprotektivní efekt. Některé geny regulované právě CCL5 hrají důležitou roli v přežívání neuronů a diferenciaci (Wynn, 2004). Tripathy a spol. ukázali, že aplikace CCL5 na primární kortikální neuronové kultury zvyšuje jejich přežívání (Tripathy et al., 2010).

Dalším upregulovaným genem po 14 dnech byl *IL11*, který má imunoregulační funkci pro IL6 a CNTF. Bylo ukázáno, že IL11 zvyšuje počet oligodendrocytů, zmírňuje demyelinizaci a zvyšuje remyelinizaci a tvorbu myelinu *in vitro* i *in vivo* (Zhang et al., 2006; Maheshwari et al., 2013; Mehler et al., 1993). Avšak přesná role IL11 v patofyziologii MP stále není plně objasněna (Cho et al., 2012).

Studiemi bylo ukázáno, že jedním ze společných cílů působení kurkuminu a EGCG je toll-like receptor 4, který je inhibován, a tím dochází k inhibici NF κ B dráhy v periferním i centrálním nervovém systému (Kuang et al., 2012; Seong et al., 2016; Youn et al., 2006). Avšak dynamika účinku léčby EGCG se od kurkuminu liší, neboť první den po léčbě EGCG je hladina většiny sledovaných cytokinů zvýšená, kurkumin má efekt opačný (Machova Urdzikova et al., 2015). To může být vysvětleno pomalejším nástupem účinku EGCG oproti kurkuminu nebo jeho nízkou dávkou.

V klasickém behaviorálním testu BBB jsme v léčených skupinách pozorovali pouze trend ve zlepšení lokomočních funkcí. Skupina léčená EGCG dosáhla signifikantně lepších výsledků v testu chůze po tyči v obou hodnocených parametrech (čas i skóre). Tento test vyžaduje složitější komplexní výkon než méně specifický BBB test. Rovněž v experimentu provedeném Alvarez -Perez a spol. (Alvarez-Perez et al., 2016) nebylo prokázáno, že by aplikace EGCG po kontuzním poranění myši míchy vedla k signifikantnímu zlepšení motoriky hodnocené běžným lokomočním testem chůze v otevřeném prostoru a statistický rozdíl byl zaznamenán až u složitějšího testu chůze po tyči, který vyžaduje kombinaci motorických dovedností s motivací a sociálními behaviorálními schopnostmi. Jak již bylo dříve popsáno, EGCG ovlivňuje akutní stresovou reakci (Adachi et al., 2006) a díky své antioxidační aktivitě zlepšuje prostorové kognitivní schopnosti učit se (Haque et al., 2006). Léčba EGCG rovněž zlepšuje učení a paměť při stresových poruchách (Soung et al., 2015). K pozorovanému zlepšení v testu chůzi po tyči může více než motorické zlepšení přispět zlepšení těchto kognitivních schopností. U zvířat léčených nanokurkuminem hlubší kinetická analýza pohybu odhalila funkční

zlepšení v parametrech výška HKK a protrakce zadních končetin, který svědčí o lepší podpoře váhy a biomechanice pohybu.

Senzorické funkce a termální hyperalgezie byla měřena plantar testem, který měří dobu potřebnou k ucuknutí zadní končetiny, na kterou je cílen termální stimul. Žádná z testovaných látek ani kombinace EGCG a kurkuminu výrazně neovlivnila termální nocicepci.

U EGCG i kurkuminu byl popsán jejich protektivní efekt na poškozenou míšní tkáň (Tian et al., 2013; Renno et al., 2014; Alvarado-Sanchez et al., 2019). Výsledky naší analýzy ukázaly místní nesignifikantní vliv EGCG a kurkuminu na zachování bílé i šedé hmoty. U skupiny léčené nanokurkuminem byl však rozdíl oproti léčené skupině signifikantní v bílé hmotě kraniálně od centra léze. Skupina s kombinací EGCG a kurkuminu se od kontrolní nelišila,jevila však silný trend ke snížení velikosti kavity. Vliv EGCG na velikost kavity byla rovněž prokázána v experimentu provedeném autory Renno a spol., kteří u léčených myší našli kromě menší oblasti léze i vyšší expresi GAP-43 (Renno et al., 2014). Nesignifikantní trend ke zvýšení počtu GAP-43 pozitivních vláken měly i naše léčby jednotlivými látkami, jejich kombinace dostáhla až téměř na hranici signifikance ($p = 0.057$).

Kurkumin i EGCG mají vliv také na počínající fibrózu a vznik gliové jizvy. U jednotlivých léčeb kurkuminem nebo EGCG jsme sice nepozorovali změny v ploše GFAP-pozitivní tkáně, došlo ale ke snížení počtu protoplazmatických astrocytů u obou skupin. Snížení počtu astrocytů po EGCG léčbě bylo popsáno i ve studii provedené Alvarez-Perez a spol. (Alvarez-Perez et al., 2016). Kombinovaná terapie neměla vliv na počet protoplazmatických astrocytů, avšak došlo k signifikantnímu snížení GFAP-pozitivní plochy v centrální části léze. Výsledky skupiny léčené nanokurkuminem ukazují signifikantně nižší plochu jizvy i snížení počtu protoplazmatických astrocytů ve středu léze. Tento lepší výsledek léčby nanokurkuminem může být dán jeho lepší dostupností v těle díky lepší rozpustnosti v tekutinách.

Ve skupině léčené EGCG jsme sledovali reakci makrofágů v místě poranění. Makrofágy bývají rozdělovány do dvou skupin – klasickou cestou aktivované M1 a alternativní M2. Zatímco akumulace M1 makrofágů podporuje zánětlivou reakci v nervové tkáni, M2 makrofágům je přisuzována schopnost blokovat zánět a podporovat

regeneraci (Kigerl et al., 2009). Avšak toto rozdělení není jednoznačné a spíše existuje celá škála buněčných typů než rozdělené skupiny (Hawthorne and Popovich, 2011). Transplantace makrofágů s M2 fenotypem nebo manipulace endogenních makrofágů do M2 fenotypu zmírňuje patologii, podporuje regeneraci a napomáhá funkčnímu zlepšení po MP u potkanů (Guerrero et al., 2012; Rapalino et al., 1998; Nakajima et al., 2012; Miron et al., 2013). Aplikace EGCG má vliv na expresi markerů makrofágů, 10 dní po MP zvyšuje genovou expresi markerů pro M1 makrofágy (*Cd86* a *Irf5*) a 28 dní po MP naopak zvyšuje genovou expresi markerů M2 makrofágů (*Cd163* a *Mrc1*). Touto změnou jejich fenotypu ovlivňuje zánětlivou reakci po MP.

EGCG, kurkumin, jejich kombinace i nanokurkumin ukázaly prospěšný vliv na následky po MP, mají imunomodulační efekt, při složitějších testech EGCG a nanokurkumin prokázal i zlepšení motorických schopností. Všechny látky ovlivňují gliovou jizvu. Nebyl prokázán synergický efekt kombinace EGCG a kurkuminu. Nanokurkumin se zdá být vhodnější a účinnější terapií. Výsledky těchto studií však podporují protizánětlivé účinky všech těchto látek.

6 ZÁVĚR

V našich studiích jsme sledovali terapeutický potenciál FBM a přírodních protizánětlivých sloučenin EGCG a kurkuminu, jejich kombinace a čisté syntetické formy nanokurkuminu na následky experimentálního MP. Ve všech studiích byl použit model balónkové kompresní léze u potkana a léčebný efekt byl sledován sérií behaviorálních testů, histologickou a imunohistochemickou analýzou spolu se stanovením hladin cytokinů a měřením genové exprese mRNA vybraných genů.

Jedním z cílů práce bylo sledovat efekt léčby laserovým světlem o dvou vlnových délkách 808nm a 905nm. Tato terapie snížila rozvoj MP a měla signifikantní vliv na funkční zlepšení. Potkani z léčené skupiny dosáhli lepších výsledků ve všech behaviorálních testech a měli rovněž signifikantně nižší míru hyperalgezie. Po léčbě byla více zachována míšň hmoty po krajích léze a došlo ke snížení počtu protoplazmatických astrocytů v kaudální části míchy. Rovněž jsme pozorovali upregulaci prospěšných M2 mikroglíí/makrofágů.

V dalších studiích jsme hodnotili vliv léčby přírodními sloučeninami EGCG, kurkuminu, jejich kombinace a čistého syntetického nanokurkuminu. Všechny zmiňované látky ovlivnily imunitní odpověď vyvolanou následky MP. Po podání EGCG jsme stanovovali aktivitu prozánětlivé dráhy NF κ B a výsledky analýzy ukázaly její sníženou aktivitu již 3 dny po MP, nejvyšší inhibici jsme pozorovali po 28 dnech. EGCG rovněž snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů CCL5, IL2, IL6, MIP1 α a IL12 během prvního týdne po MP. Ovlivňuje také fenotyp makrofágů v místě léze, nejprve zvýšením genové exprese markerů M1 10 dnů po MP, poté zvýšením markerů M2 28 dní po MP.

Po kombinovaném podání EGCG a kurkuminu jsme pozorovali pouze trend ke zvýšené tvorbě nových axonálních kolaterál a menší kavitu v místě po poranění. Porovnáním výsledků s jednotlivými aplikacemi jsme neprokázali jejich synergický efekt.

Posledním cílem práce bylo podání syntetického nanokurkuminu navázaného na nanonosič a hodnocení efektu jeho aplikace na následky MP. V této studii jsme potvrdili protizánětlivé účinky kurkuminu a jeho schopnost modulovat kaskádu sekundárních reakcí po MP. Ve skupině zvířat léčené nanokurkuminem byla více zachována bílá míšň hmoty v kranialní části, snížená tvorba gliové jizvy a nižší počet protoplazmatických astrocytů. 24 hodin po MP došlo k signifikantnímu snížení hladiny mRNA *IL11* a

pozorovali jsme silný trend k poklesu mRNA prozánětlivého cytokinu *Il1 β* a mírné snížení dalších prozánětlivých cytokinů jako *Tnfa*, *Il6*, *Ifny* a *Ccl5*. 14 dní po MP byla hladina mRNA protizánětlivých cytokinů *Il10* a *Il13* mírně zvýšena oproti kontrolní skupině a nastala signifikantní upregulace *Il12*.

7 SOUHRN

Všechny naše studie ukázaly terapeutický potenciál při léčbě následků experimentálního poranění míchy potkana způsobené balónkovou kompresní lézí. FBM, EGCG, kurkumin, jejich kombinace i nanokurkumin mají imunomodulační efekt a ovlivňují gliovou jizvu. FBM má signifikantní vliv na rychlejší funkční zlepšení zadních končetin, což bylo prokázáno širokou sérií testů včetně kvantitativní analýzy. Naše výsledky naznačují, že na tomto efektu se může podílet schopnost FBM ovlivňovat fenotyp mikroglíí/makrofágů do M2 typu.

Při srovnání podání samotných látek EGCG, kurkuminu a jejich kombinace nebyl prokázán synergický efekt. Obě látky mírně přispívají k zachování tkáně a zmírňují imunitní odpověď, jejich kombinací však nebylo dosaženo lepších výsledků. Důvodem může být nedostatečná biologická dostupnost kurkuminu v séru a tkáních díky jeho špatné rozpustnosti a rychlé metabolizaci v játrech a střevech. O řešení tohoto problému je usilováno úpravou vlastností této molekuly. Pro naši další studii jsme použili vysoce čistý kurkumin spojený s Lipodisq™, což jsou lipidové diskoidní biodegradabilní nanočástice o průměru 10 – 25 nm, které umožňují inkorporaci hydrofobních a špatně rozpustných sloučenin. Samotný kurkumin je rozpustný v organických rozpouštědlech a není rozpustný ve vodě, avšak nanokurkumin (kurkumin spojený s Lipodisq™) je rozpustný ve vodě i fyziologickém roztoku.

U všech sledovaných terapií zůstává otázkou jejich způsob podání a dávkování. Všechny terapie vykazují duální charakter, v příliš vysokých koncentracích (energiích) jsou škodlivé a toxické, proto je potřeba dalších výzkumných prací. Výsledky našich studií však podporují protizánětlivé účinky všech těchto terapií.

8 SUMMARY

Our studies showed the therapeutic potential for treatment of SCI in rats. We used experimental model of injury caused by balloon compression lesion. Photobiomodulation, EGCG, curcumin, their combination and nanocurcumin have an immunomodulatory effect and they influence the formation of glial scar. Photobiomodulation has significant effect on faster functional recovery of hindlimbs, which was proved by broad battery of tests including quantitative kinetic analysis of the movement. Our results suggest the influence of photobiomodulation on polarization of microglia/macrophages to M2 phenotype.

We did not observe the synergic effect of combination treatment of EGCG and curcumin when comparing with individual treatments. Both compounds slightly preserved spinal cord tissue and mitigated immune response, but better results were not obtained by the combination of the compounds. The reason might be the inadequate biological availability in serum and tissue due to poor solubility and fast metabolism of the curcumin. The modification of properties of curcumin should help. For our next study we used highly pure curcumin binded to Lipodisq™, which are lipid discoid biodegradable nanocarriers enabling incorporation of hydrophobic and poorly soluble compounds. Curcumin itself is soluble only in organic dissolving agents and non-soluble in water. However, nanocurcumin is soluble in water and physiological solutions.

Further investigation is needed for finding the best route of administration and dosage. All therapies show biphasic character and they are harmful in too high concentrations (energies). However, our results demonstrated the anti-inflammatory effect of all therapies.

9 LITERATURA

1. Ahuja, C.S.; Wilson, J.R.; Nori, S.; Kotter, M.R.N.; Druschel, C.; Curt, A.; Fehlings, M.G. Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Apr 27;3:17018.
2. Priyadarsini, K.I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014 Dec 1;19(12):20091-20112.
3. Filipp, M.E.; Travis, B.J.; Henry, S.S.; Idzikowski, E.C.; Magnuson, S.A.; Loh, M.Y.; Hellenbrand, D.J.; Hanna, A.S. Differences in neuroplasticity after spinal cord injury in varying animal models and humans. *Neural Regen Res*. 2019 Jan;14(1):7-19.
4. Nelson, K.M.; Dahlin, J.L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem*. 2017 Mar 9;60(5):1620-1637.
5. JEP, Č.s.p.m.l.Č. Available from: <https://sciday.cz/misni-leze>
6. Burney, R.E.; Maio, R.F.; Maynard, F.; Karunas, R. Incidence, characteristics, and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg*. 1993 May;128(5):596-599.
7. Sekhon, L.H.; Fehlings, M.G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001 Dec 15;26(24 Suppl):S2-12.
8. Tator, C.H. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*. 1995 Oct;5(4):407-413.
9. Nystrom, B.; Berglund, J.E. Spinal cord restitution following compression injuries in rats. *Acta Neurol Scand*. 1988 Dec;78(6):467-472.
10. LaPlaca, M.C.; Simon, C.M.; Prado, G.R.; Cullen, D.K. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res*. 2007;161:13-26.
11. Choo, A.M.; Liu, J.; Lam, C.K.; Dvorak, M.; Tetzlaff, W.; Oxland, T.R. Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2007 Mar;6(3):255-266.
12. Nashmi, R.; Fehlings, M.G. Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience*. 2001;104(1):235-251.
13. Faulkner, J.R.; Herrmann, J.E.; Woo, M.J.; Tansey, K.E.; Doan, N.B.; Sofroniew, M.V. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2004 Mar 3;24(9):2143-2155.
14. Ehlers, M.D. Deconstructing the axon: Wallerian degeneration and the ubiquitin-proteasome system. *Trends Neurosci*. 2004 Jan;27(1):3-6.
15. Guha, A.; Tator, C.H.; Rochon, J. Spinal cord blood flow and systemic blood pressure after experimental spinal cord injury in rats. *Stroke*. 1989 Mar;20(3):372-377.
16. Guha, A.; Tator, C.H. Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J Trauma*. 1988 Apr;28(4):481-490.
17. Anthes, D.L.; Theriault, E.; Tator, C.H. Ultrastructural evidence for arteriolar vasospasm after spinal cord trauma. *Neurosurgery*. 1996 Oct;39(4):804-814.

18. Stys, P.K.; Lopachin, R.M. Mechanisms of calcium and sodium fluxes in anoxic myelinated central nervous system axons. *Neuroscience*. 1998 Jan;82(1):21-32.
19. Agrawal, S.K.; Fehlings, M.G. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na(+)-K(+)-ATPase, the Na(+)-H⁺ exchanger, and the Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci*. 1996 Jan 15;16(2):545-552.
20. Li, S.; Stys, P.K. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J Neurosci*. 2000 Feb 1;20(3):1190-1198.
21. Li, S.; Mealing, G.A.; Morley, P.; Stys, P.K. Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. *J Neurosci*. 1999 Jul 15;19(14):RC16.
22. McAdoo, D.J.; Xu, G.Y.; Robak, G.; Hughes, M.G. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol*. 1999 Oct;159(2):538-544.
23. Liu, D.; Xu, G.Y.; Pan, E.; McAdoo, D.J. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*. 1999;93(4):1383-1389.
24. Anderson, D.K.; Means, E.D.; Waters, T.R.; Spears, C.J. Spinal cord energy metabolism following compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg*. 1980 Sep;53(3):375-380.
25. Braughler, J.M.; Hall, E.D. Effects of multi-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J Neurosurg*. 1984 Aug;61(2):290-295.
26. Banik, N.L.; Matzelle, D.C.; Gantt-Wilford, G.; Osborne, A.; Hogan, E.L. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Res*. 1997 Mar 28;752(1-2):301-306.
27. Hall, E.D. Free radicals and CNS injury. *Crit Care Clin*. 1989 Oct;5(4):793-805.
28. Lewen, A.; Matz, P.; Chan, P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*. 2000 Oct;17(10):871-890.
29. Donnelly, D.J.; Popovich, P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008 Feb;209(2):378-388.
30. Mronga, T.; Stahnke, T.; Goldbaum, O.; Richter-Landsberg, C. Mitochondrial pathway is involved in hydrogen-peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *Glia*. 2004 May;46(4):446-455.
31. Bao, F.; Liu, D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. *Neuroscience*. 2003;116(1):59-70.
32. Carlson, S.L.; Parrish, M.E.; Springer, J.E.; Doty, K.; Dossett, L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol*. 1998 May;151(1):77-88.
33. Popovich, P.G.; Wei, P.; Stokes, B.T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*. 1997 Jan 20;377(3):443-464.
34. Hausmann, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2003 Jul;41(7):369-378.
35. Fleming, J.C.; Norenberg, M.D.; Ramsay, D.A.; Dekaban, G.A.; Marcillo, A.E.; Saenz, A.D.; Pasquale-Styles, M.; Dietrich, W.D.; Weaver, L.C. The cellular

- inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*. 2006 Dec;129(Pt 12):3249-3269.
36. Noble, L.J.; Wrathall, J.R. Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res*. 1989 Mar 13;482(1):57-66.
 37. Schnell, L.; Fearn, S.; Schwab, M.E.; Perry, V.H.; Anthony, D.C. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Mar;58(3):245-254.
 38. Sroga, J.M.; Jones, T.B.; Kigerl, K.A.; McGaughy, V.M.; Popovich, P.G. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 2003 Jul 21;462(2):223-240.
 39. Blight, A.R. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992 Mar;9 Suppl 1:S83-91.
 40. Kigerl, K.A.; Gensel, J.C.; Ankeny, D.P.; Alexander, J.K.; Donnelly, D.J.; Popovich, P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009 Oct 28;29(43):13435-13444.
 41. Popovich, P.G.; Guan, Z.; Wei, P.; Huitinga, I.; van Rooijen, N.; Stokes, B.T. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 1999 Aug;158(2):351-365.
 42. Shechter, R.; London, A.; Varol, C.; Raposo, C.; Cusimano, M.; Yovel, G.; Rolls, A.; Mack, M.; Pluchino, S.; Martino, G.; Jung, S.; Schwartz, M. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med*. 2009 Jul;6(7):e1000113.
 43. Hawthorne, A.L.; Popovich, P.G. Emerging concepts in myeloid cell biology after spinal cord injury. *Neurotherapeutics*. 2011 Apr;8(2):252-261.
 44. Guerrero, A.R.; Uchida, K.; Nakajima, H.; Watanabe, S.; Nakamura, M.; Johnson, W.E.; Baba, H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2012 Feb 27;9:40.
 45. Rapalino, O.; Lazarov-Spiegler, O.; Agranov, E.; Velan, G.J.; Yoles, E.; Fraidakis, M.; Solomon, A.; Gepstein, R.; Katz, A.; Belkin, M.; Hadani, M.; Schwartz, M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):814-821.
 46. Nakajima, H.; Uchida, K.; Guerrero, A.R.; Watanabe, S.; Sugita, D.; Takeura, N.; Yoshida, A.; Long, G.; Wright, K.T.; Johnson, W.E.; Baba, H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012 May 20;29(8):1614-1625.
 47. Miron, V.E.; Boyd, A.; Zhao, J.W.; Yuen, T.J.; Ruckh, J.M.; Shadrach, J.L.; van Wijngaarden, P.; Wagers, A.J.; Williams, A.; Franklin, R.J.M.; Ffrench-Constant, C. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2013 Sep;16(9):1211-1218.
 48. Moalem, G.; Gdalyahu, A.; Shani, Y.; Otten, U.; Lazarovici, P.; Cohen, I.R.; Schwartz, M. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun*. 2000 Nov;15(3):331-345.

49. Schwartz, M.; Moalem, G.; Leibowitz-Amit, R.; Cohen, I.R. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.* 1999 Jul;22(7):295-299.
50. Ellis, R.E.; Yuan, J.Y.; Horvitz, H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 1991;7:663-698.
51. Casha, S.; Yu, W.R.; Fehlings, M.G. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience.* 2001;103(1):203-218.
52. Grossman, S.D.; Rosenberg, L.J.; Wrathall, J.R. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol.* 2001 Apr;168(2):273-282.
53. Mills, L.R.; Velumian, A.A.; Agrawal, S.K.; Theriault, E.; Fehlings, M.G. Confocal imaging of changes in glial calcium dynamics and homeostasis after mechanical injury in rat spinal cord white matter. *Neuroimage.* 2004 Mar;21(3):1069-1082.
54. Ankarcona, M.; Dypbukt, J.M.; Bonfoco, E.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S.; Lipton, S.A.; Nicotera, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995 Oct;15(4):961-973.
55. Buss, A.; Pech, K.; Kakulas, B.A.; Martin, D.; Schoenen, J.; Noth, J.; Brook, G.A. Growth-modulating molecules are associated with invading Schwann cells and not astrocytes in human traumatic spinal cord injury. *Brain.* 2007 Apr;130(Pt 4):940-953.
56. Jones, L.L.; Margolis, R.U.; Tuszynski, M.H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003 Aug;182(2):399-411.
57. Noble, P.W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 2002 Jan;21(1):25-29.
58. Horner, P.J.; Power, A.E.; Kempermann, G.; Kuhn, H.G.; Palmer, T.D.; Winkler, J.; Thal, L.J.; Gage, F.H. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 2000 Mar 15;20(6):2218-2228.
59. Hill, C.E.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C. Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol.* 2001 Sep;171(1):153-169.
60. Silver, J.; Schwab, M.E.; Popovich, P.G. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Dec 4;7(3):a020602.
61. Romero, M.I.; Rangappa, N.; Li, L.; Lightfoot, E.; Garry, M.G.; Smith, G.M. Extensive sprouting of sensory afferents and hyperalgesia induced by conditional expression of nerve growth factor in the adult spinal cord. *J Neurosci.* 2000 Jun 15;20(12):4435-4445.
62. Weaver, L.C.; Marsh, D.R.; Gris, D.; Brown, A.; Dekaban, G.A. Autonomic dysreflexia after spinal cord injury: central mechanisms and strategies for prevention. *Prog Brain Res.* 2006;152:245-263.
63. Sharif-Alhoseini, M.; Khormali, M.; Rezaei, M.; Safdarian, M.; Hajighadery, A.; Khalatbari, M.M.; Safdarian, M.; Meknatkhah, S.; Rezvan, M.; Chalangari, M.;

- Derakhshan, P.; Rahimi-Movaghar, V. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*. 2017 Aug;55(8):714-721.
64. Kjell, J.; Olson, L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Dis Model Mech*. 2016 Oct 1;9(10):1125-1137.
65. Rosenzweig, E.S.; McDonald, J.W. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr Opin Neurol*. 2004 Apr;17(2):121-131.
66. Vanicky, I.; Urdzikova, L.; Saganova, K.; Cizkova, D.; Galik, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma*. 2001 Dec;18(12):1399-1407.
67. Carlson, G.D.; Minato, Y.; Okada, A.; Gorden, C.D.; Warden, K.E.; Barbeau, J.M.; Biro, C.L.; Bahnuik, E.; Bohlman, H.H.; Lamanna, J.C. Early time-dependent decompression for spinal cord injury: vascular mechanisms of recovery. *J Neurotrauma*. 1997 Dec;14(12):951-962.
68. Dimar, J.R., 2nd; Glassman, S.D.; Raque, G.H.; Zhang, Y.P.; Shields, C.B. The influence of spinal canal narrowing and timing of decompression on neurologic recovery after spinal cord contusion in a rat model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999 Aug 15;24(16):1623-1633.
69. Dolan, E.J.; Tator, C.H.; Endrenyi, L. The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. *J Neurosurg*. 1980 Dec;53(6):749-755.
70. Fehlings, M.G.; Perrin, R.G. The role and timing of early decompression for cervical spinal cord injury: update with a review of recent clinical evidence. *Injury*. 2005 Jul;36 Suppl 2:B13-26.
71. Cregg, J.M.; DePaul, M.A.; Filous, A.R.; Lang, B.T.; Tran, A.; Silver, J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol*. 2014 Mar;253:197-207.
72. Sun, G.D.; Chen, Y.; Zhou, Z.G.; Yang, S.X.; Zhong, C.; Li, Z.Z. A progressive compression model of thoracic spinal cord injury in mice: function assessment and pathological changes in spinal cord. *Neural Regen Res*. 2017 Aug;12(8):1365-1374.
73. Gruner, J.A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1992 Summer;9(2):123-126; discussion 126-128.
74. Muir, G.D.; Webb, A.A. Mini-review: assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *Eur J Neurosci*. 2000 Sep;12(9):3079-3086.
75. Ahmed, R.U.; Alam, M.; Zheng, Y.P. Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*. 2019 Mar;5(3):e01324.
76. Bunge, R.P.; Puckett, W.R.; Becerra, J.L.; Marcillo, A.; Quencer, R.M. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol*. 1993;59:75-89.
77. Bunge, R.P.; Puckett, W.R.; Hiester, E.D. Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol*. 1997;72:305-315.
78. Josephson, A.; Greitz, D.; Klason, T.; Olson, L.; Spenger, C. A spinal thecal sac constriction model supports the theory that induced pressure gradients in the cord cause edema and cyst formation. *Neurosurgery*. 2001 Mar;48(3):636-645; discussion 645-636.

79. Ma, M.; Basso, D.M.; Walters, P.; Stokes, B.T.; Jakeman, L.B. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse. *Exp Neurol*. 2001 Jun;169(2):239-254.
80. Goritz, C.; Dias, D.O.; Tomilin, N.; Barbacid, M.; Shupliakov, O.; Frisen, J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*. 2011 Jul 8;333(6039):238-242.
81. Friedli, L.; Rosenzweig, E.S.; Barraud, Q.; Schubert, M.; Dominici, N.; Awai, L.; Nielson, J.L.; Musienko, P.; Nout-Lomas, Y.; Zhong, H.; Zdunowski, S.; Roy, R.R.; Strand, S.C.; van den Brand, R.; Havton, L.A.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C.; Bezard, E.; Bloch, J.; Edgerton, V.R.; Ferguson, A.R.; Curt, A.; Tuszynski, M.H.; Courtine, G. Pronounced species divergence in corticospinal tract reorganization and functional recovery after lateralized spinal cord injury favors primates. *Sci Transl Med*. 2015 Aug 26;7(302):302ra134.
82. Lemon, R.N.; Griffiths, J. Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve*. 2005 Sep;32(3):261-279.
83. Darian-Smith, C. Synaptic plasticity, neurogenesis, and functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscientist*. 2009 Apr;15(2):149-165.
84. Onodera, S.; Hicks, T.P. A comparative neuroanatomical study of the red nucleus of the cat, macaque and human. *PLoS One*. 2009 Aug 13;4(8):e6623.
85. Liu, X.Z.; Xu, X.M.; Hu, R.; Du, C.; Zhang, S.X.; McDonald, J.W.; Dong, H.X.; Wu, Y.J.; Fan, G.S.; Jacquin, M.F.; Hsu, C.Y.; Choi, D.W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997 Jul 15;17(14):5395-5406.
86. Citron, B.A.; Arnold, P.M.; Sebastian, C.; Qin, F.; Malladi, S.; Ameenuddin, S.; Landis, M.E.; Festoff, B.W. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol*. 2000 Dec;166(2):213-226.
87. Emery, E.; Aldana, P.; Bunge, M.B.; Puckett, W.; Srinivasan, A.; Keane, R.W.; Bethea, J.; Levi, A.D. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1998 Dec;89(6):911-920.
88. Faden, A.I.; Simon, R.P. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol*. 1988 Jun;23(6):623-626.
89. Nakashima, S.; Arnold, S.A.; Mahoney, E.T.; Sithu, S.D.; Zhang, Y.P.; D'Souza, S.E.; Shields, C.B.; Hagg, T. Small-molecule protein tyrosine phosphatase inhibition as a neuroprotective treatment after spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci*. 2008 Jul 16;28(29):7293-7303.
90. Abbasi, M.; Salehi, M.; Pasbakhsh, P.; Sobhani, A. Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell. *J Stem Cells Regen Med*. 2010;6(2):81.
91. Kamelska-Sadowska, A.M.; Wojtkiewicz, J.; Kowalski, I.M. Review of the Current Knowledge on the Role of Stem Cell Transplantation in Neurorehabilitation. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3290894.
92. Chen, S.; Levi, A.D. Restorative Treatments for Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2017 Jan;28(1):63-71.
93. Ducker, T.B.; Hamit, H.F. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1969 Jun;30(6):693-697.

94. Young, W.; DeCrescito, V.; Flamm, E.S.; Blight, A.R.; Gruner, J.A. Pharmacological therapy of acute spinal cord injury: studies of high dose methylprednisolone and naloxone. *Clin Neurosurg.* 1988;34:675-697.
95. Kokoszka, J.E.; Coskun, P.; Esposito, L.A.; Wallace, D.C. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001 Feb 27;98(5):2278-2283.
96. Tator, C.H. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury. *Inj Prev.* 2002 Dec;8 Suppl 4:IV33-36.
97. Bose, B.; Osterholm, J.L.; Kalia, M. Ganglioside-induced regeneration and reestablishment of axonal continuity in spinal cord-transected rats. *Neuroscience letters.* 1986 Jan 16;63(2):165-169.
98. Geisler, F.H.; Coleman, W.P.; Grieco, G.; Poonian, D.; Sygen Study, G. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001 Dec 15;26(24 Suppl):S87-98.
99. Springer, J.E.; Azbill, R.D.; Kennedy, S.E.; George, J.; Geddes, J.W. Rapid calpain I activation and cytoskeletal protein degradation following traumatic spinal cord injury: attenuation with riluzole pretreatment. *J Neurochem.* 1997 Oct;69(4):1592-1600.
100. Stutzmann, J.M.; Pratt, J.; Boraud, T.; Gross, C. The effect of riluzole on post-traumatic spinal cord injury in the rat. *Neuroreport.* 1996 Jan 31;7(2):387-392.
101. Abrams, M.B.; Nilsson, I.; Lewandowski, S.A.; Kjell, J.; Codeluppi, S.; Olson, L.; Eriksson, U. Imatinib enhances functional outcome after spinal cord injury. *PLoS One.* 2012;7(6):e38760.
102. Kaptanoglu, E.; Beskonakli, E.; Okutan, O.; Selcuk Surucu, H.; Taskin, Y. Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. *J Clin Neurosci.* 2003 May;10(3):329-334.
103. Hamblin, M.R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 2017a;4(3):337-361.
104. Moreira, M.S.; Velasco, I.T.; Ferreira, L.S.; Ariga, S.K.; Barbeiro, D.F.; Meneguzzo, D.T.; Abatepaulo, F.; Marques, M.M. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology.* 2009 Dec 2;97(3):145-151.
105. Fillipin, L.I.; Mauriz, J.L.; Vedovelli, K.; Moreira, A.J.; Zettler, C.G.; Lech, O.; Marroni, N.P.; Gonzalez-Gallego, J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005 Oct;37(4):293-300.
106. Wang, X.L.; Tian, F.H.; Soni, S.S.; Gonzalez-Lima, F.; Liu, H.L. Interplay between up-regulation of cytochrome-c-oxidase and hemoglobin oxygenation induced by near-infrared laser. *Sci Rep-Uk.* 2016 Aug 3;6.
107. Quirk, B.J.; Torbey, M.; Buchmann, E.; Verma, S.; Whelan, H.T. Near-infrared photobiomodulation in an animal model of traumatic brain injury: improvements at the behavioral and biochemical levels. *Photomed Laser Surg.* 2012 Sep;30(9):523-529.

108. Karu, T.I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*. 2010 Aug;62(8):607-610.
109. Mason, M.G.; Nicholls, P.; Cooper, C.E. Re-evaluation of the near infrared spectra of mitochondrial cytochrome c oxidase: Implications for non invasive in vivo monitoring of tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1837(11):1882-1891.
110. Karu, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1999 Mar;49(1):1-17.
111. Greco, M.; Guida, G.; Perlino, E.; Marra, E.; Quagliariello, E. Increase in Rna and Protein-Synthesis by Mitochondria Irradiated with Helium-Neon Laser. *Biochem Bioph Res Co*. 1989 Sep 29;163(3):1428-1434.
112. Lane, N. Cell biology: power games. *Nature*. 2006 Oct 26;443(7114):901-903.
113. Wong-Riley, M.T.; Bai, X.; Buchmann, E.; Whelan, H.T. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport*. 2001 Oct 08;12(14):3033-3037.
114. Wong-Riley, M.T.; Liang, H.L.; Eells, J.T.; Chance, B.; Henry, M.M.; Buchmann, E.; Kane, M.; Whelan, H.T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4761-4771.
115. Whelan, H.T.; Smits, R.L.; Buchman, E.V.; Whelan, N.T.; Turner, S.G.; Margolis, D.A.; Cevenini, V.; Stinson, H.; Ignatius, R.; Martin, T.; Cwiklinski, J.; Philippi, A.F.; Graf, W.R.; Hodgson, B.; Gould, L.; Kane, M.; Chen, G.; Caviness, J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Sur*. 2001 Dec;19(6):305-314.
116. Rochkind, S.; Rousso, M.; Nissan, M.; Villarreal, M.; Barrnea, L.; Rees, D.G. Systemic Effects of Low-Power Laser Irradiation on the Peripheral and Central Nervous-System, Cutaneous Wounds, and Burns. *Laser Surg Med*. 1989;9(2):174-182.
117. Geneva, II. Photobiomodulation for the treatment of retinal diseases: a review. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(1):145-152.
118. Chow, R.T.; Johnson, M.I.; Lopes-Martins, R.A.; Bjordal, J.M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet*. 2009 Dec 05;374(9705):1897-1908.
119. Silveira, P.C.L.; Scheffer, D.D.; Glaser, V.; Remor, A.P.; Pinho, R.A.; Aguiar, A.S.; Latini, A. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radical Res*. 2016 May 3;50(5):503-513.
120. Hamblin, M.R. Photobiomodulation for Traumatic Brain Injury and Stroke. *J Neurosci Res*. 2017b Nov 13.
121. Oron, A.; Oron, U.; Streeter, J.; De Taboada, L.; Alexandrovich, A.; Trembovler, V.; Shohami, E. Low-level laser therapy applied transcranially to mice following traumatic brain injury significantly reduces long-term neurological deficits. *Journal of Neurotrauma*. 2007 Apr;24(4):651-656.
122. Naeser, M.A.; Zafonte, R.; Kregel, M.H.; Martin, P.I.; Frazier, J.; Hamblin, M.R.; Knight, J.A.; Meehan, W.P., 3rd; Baker, E.H. Significant improvements in cognitive performance post-transcranial, red/near-infrared light-emitting diode

- treatments in chronic, mild traumatic brain injury: open-protocol study. *J Neurotrauma*. 2014 Jun 01;31(11):1008-1017.
123. Yang, L.; Tucker, D.; Dong, Y.; Wu, C.; Lu, Y.; Li, Y.; Zhang, J.; Liu, T.C.; Zhang, Q. Photobiomodulation therapy promotes neurogenesis by improving post-stroke local microenvironment and stimulating neuroprogenitor cells. *Exp Neurol*. 2018 Jan;299(Pt A):86-96.
 124. Naeser, M.A.; Hamblin, M.R. Potential for transcranial laser or LED therapy to treat stroke, traumatic brain injury, and neurodegenerative disease. *Photomed Laser Surg*. 2011 Jul;29(7):443-446.
 125. De Taboada, L.; Yu, J.; El-Amouri, S.; Gattoni-Celli, S.; Richieri, S.; McCarthy, T.; Streeter, J.; Kindy, M.S. Transcranial laser therapy attenuates amyloid-beta peptide neuropathology in amyloid-beta protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(3):521-535.
 126. Morries, L.D.; Cassano, P.; Henderson, T.A. Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015;11:2159-2175.
 127. Wu, Q.; Xuan, W.; Ando, T.; Xu, T.; Huang, L.; Huang, Y.Y.; Dai, T.; Dhital, S.; Sharma, S.K.; Whalen, M.J.; Hamblin, M.R. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. *Lasers Surg Med*. 2012a Mar;44(3):218-226.
 128. Karu, T.I.; Pyatibrat, L.V.; Afanasyeva, N.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med*. 2005 Apr;36(4):307-314.
 129. Anders, J.J.; Moges, H.; Wu, X.; Erbele, I.D.; Alberico, S.L.; Saidu, E.K.; Smith, J.T.; Pryor, B.A. In vitro and in vivo optimization of infrared laser treatment for injured peripheral nerves. *Lasers Surg Med*. 2014 Jan;46(1):34-45.
 130. Amaroli, A.; Marcoli, M.; Venturini, A.; Passalacqua, M.; Agnati, L.F.; Signore, A.; Raffetto, M.; Maura, G.; Benedicenti, S.; Cervetto, C. Near-infrared laser photons induce glutamate release from cerebrocortical nerve terminals. *J Biophotonics*. 2018 Nov;11(11):e201800102.
 131. Byrnes, K.R.; Waynant, R.W.; Ilev, I.K.; Wu, X.; Barna, L.; Smith, K.; Heckert, R.; Gerst, H.; Anders, J.J. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg Med*. 2005 Mar;36(3):171-185.
 132. Kim, J.; Kim, E.H.; Lee, K.; Kim, B.; Kim, Y.; Na, S.H.; Yoon, Y.W. Low-Level Laser Irradiation Improves Motor Recovery After Contusive Spinal Cord Injury in Rats. *Tissue Eng Regen Med*. 2017 Feb;14(1):57-64.
 133. Wu, X.; Dmitriev, A.E.; Cardoso, M.J.; Viers-Costello, A.G.; Borke, R.C.; Streeter, J.; Anders, J.J. 810 nm Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. *Lasers Surg Med*. 2009 Jan;41(1):36-41.
 134. Paula, A.A.; Nicolau, R.A.; Lima, M.D.; Salgado, M.A.C.; Cogo, J.C. "Low-intensity laser therapy effect on the recovery of traumatic spinal cord injury". *Laser Med Sci*. 2014 Nov;29(6):1849-1859.
 135. Song, J.W.; Li, K.; Liang, Z.W.; Dai, C.; Shen, X.F.; Gong, Y.Z.; Wang, S.; Hu, X.Y.; Wang, Z. Low-level laser facilitates alternatively activated macrophage/microglia polarization and promotes functional recovery after crush spinal cord injury in rats. *Sci Rep*. 2017 Apr 4;7(1):620.

136. Hu, D.; Zhu, S.Y.; Potas, J.R. Red LED photobiomodulation reduces pain hypersensitivity and improves sensorimotor function following mild T10 hemicontusion spinal cord injury. *J Neuroinflamm.* 2016 Aug 26;13.
137. Thao, N.P.; Luyen, B.T.; Widowati, W.; Fauziah, N.; Maesaroh, M.; Herlina, T.; Manzoor, Z.; Ali, I.; Koh, Y.S.; Kim, Y.H. Anti-inflammatory Flavonoid C-Glycosides from Piper aduncum Leaves. *Planta Med.* 2016 Nov;82(17):1475-1481.
138. Baharfar, R.; Azimi, R.; Mohseni, M. Antioxidant and antibacterial activity of flavonoid-, polyphenol- and anthocyanin-rich extracts from *Thymus kotschyanus* boiss & hohen aerial parts. *J Food Sci Technol.* 2015 Oct;52(10):6777-6783.
139. Yin, D.; Li, J.; Lei, X.; Liu, Y.; Yang, Z.; Chen, K. Antiviral Activity of Total Flavonoid Extracts from *Selaginella moellendorffii* Hieron against Cocksackie Virus B3 In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:950817.
140. Saeed, M.; Kadioglu, O.; Khalid, H.; Sugimoto, Y.; Efferth, T. Activity of the dietary flavonoid, apigenin, against multidrug-resistant tumor cells as determined by pharmacogenomics and molecular docking. *J Nutr Biochem.* 2015 Jan;26(1):44-56.
141. Macready, A.L.; George, T.W.; Chong, M.F.; Alimbetov, D.S.; Jin, Y.; Vidal, A.; Spencer, J.P.; Kennedy, O.B.; Tuohy, K.M.; Minihane, A.M.; Gordon, M.H.; Lovegrove, J.A.; Group, F.S. Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease--FLAVURS: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014 Mar;99(3):479-489.
142. Kimura, M.; Umegaki, K.; Kasuya, Y.; Sugisawa, A.; Higuchi, M. The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Dec;56(12):1186-1193.
143. Khalatbary, A.R.; Tiraihi, T.; Boroujeni, M.B.; Ahmadvand, H.; Tavafi, M.; Tamjidipoor, A. Effects of epigallocatechin gallate on tissue protection and functional recovery after contusive spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2010 Jan 8;1306:168-175.
144. Khalatbary, A.R.; Ahmadvand, H. Anti-inflammatory effect of the epigallocatechin gallate following spinal cord trauma in rat. *Iran Biomed J.* 2011;15(1-2):31-37.
145. Walker, J.M.; Klakotskaia, D.; Ajit, D.; Weisman, G.A.; Wood, W.G.; Sun, G.Y.; Serfozo, P.; Simonyi, A.; Schachtman, T.R. Beneficial effects of dietary EGCG and voluntary exercise on behavior in an Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis.* 2015;44(2):561-572.
146. Reznichenko, L.; Kalfon, L.; Amit, T.; Youdim, M.B.; Mandel, S.A. Low dosage of rasagiline and epigallocatechin gallate synergistically restored the nigrostriatal axis in MPTP-induced parkinsonism. *Neurodegener Dis.* 2010;7(4):219-231.
147. Xu, Z.; Chen, S.; Li, X.; Luo, G.; Li, L.; Le, W. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res.* 2006 Oct;31(10):1263-1269.
148. Park, J.W.; Hong, J.S.; Lee, K.S.; Kim, H.Y.; Lee, J.J.; Lee, S.R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate reduces matrix metalloproteinase-9 activity following transient focal cerebral ischemia. *J Nutr Biochem.* 2010 Nov;21(11):1038-1044.

149. Kian, K.; Khalatbary, A.R.; Ahmadvand, H.; Karimpour Malekshah, A.; Shams, Z. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against peripheral nerve transection-induced apoptosis. *Nutr Neurosci*. 2018 Jan 2;1-9.
150. Wei, I.H.; Tu, H.C.; Huang, C.C.; Tsai, M.H.; Tseng, C.Y.; Shieh, J.Y. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates NADPH-d/nNOS expression in motor neurons of rats following peripheral nerve injury. *BMC Neurosci*. 2011 Jun 1;12:52.
151. Ge, R.; Zhu, Y.; Diao, Y.; Tao, L.; Yuan, W.; Xiong, X.C. Anti-edema effect of epigallocatechin gallate on spinal cord injury in rats. *Brain Res*. 2013 Aug 21;1527:40-46.
152. Alvarez-Perez, B.; Homs, J.; Bosch-Mola, M.; Puig, T.; Reina, F.; Verdu, E.; Boadas-Vaello, P. Epigallocatechin-3-gallate treatment reduces thermal hyperalgesia after spinal cord injury by down-regulating RhoA expression in mice. *Eur J Pain*. 2016 Mar;20(3):341-352.
153. Tian, W.; Han, X.G.; Liu, Y.J.; Tang, G.Q.; Liu, B.; Wang, Y.Q.; Xiao, B.; Xu, Y.F. Intrathecal epigallocatechin gallate treatment improves functional recovery after spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF. *Neurochem Res*. 2013 Apr;38(4):772-779.
154. Renno, W.M.; Al-Maghrebi, M.; Rao, M.S.; Khraishah, H. (-)-Epigallocatechin-3-gallate modulates spinal cord neuronal degeneration by enhancing growth-associated protein 43, B-cell lymphoma 2, and decreasing B-cell lymphoma 2-associated x protein expression after sciatic nerve crush injury. *J Neurotrauma*. 2015 Feb 1;32(3):170-184.
155. Renno, W.M.; Al-Khaledi, G.; Mousa, A.; Karam, S.M.; Abul, H.; Asfar, S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates neurological function when intravenously infused in acute and, chronically injured spinal cord of adult rats. *Neuropharmacology*. 2014 Feb;77:100-119.
156. Zhang, P.; Holscher, C.; Ma, X. Therapeutic potential of flavonoids in spinal cord injury. *Rev Neurosci*. 2017a Jan 1;28(1):87-101.
157. Maiti, P.; Dunbar, G.L. Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 May 31;19(6).
158. Panahi, Y.; Hosseini, M.S.; Khalili, N.; Naimi, E.; Majeed, M.; Sahebkar, A. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. *Clin Nutr*. 2015 Dec;34(6):1101-1108.
159. Yue, G.G.; Chan, B.C.; Hon, P.M.; Lee, M.Y.; Fung, K.P.; Leung, P.C.; Lau, C.B. Evaluation of in vitro anti-proliferative and immunomodulatory activities of compounds isolated from *Curcuma longa*. *Food Chem Toxicol*. 2010 Aug-Sep;48(8-9):2011-2020.
160. Hu, S.; Maiti, P.; Ma, Q.; Zuo, X.; Jones, M.R.; Cole, G.M.; Frautschy, S.A. Clinical development of curcumin in neurodegenerative disease. *Expert Rev Neurother*. 2015 Jun;15(6):629-637.
161. Khurana, S.; Venkataraman, K.; Hollingsworth, A.; Piche, M.; Tai, T.C. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*. 2013 Sep 26;5(10):3779-3827.

162. Vecchi Brumatti, L.; Marcuzzi, A.; Tricarico, P.M.; Zanin, V.; Girardelli, M.; Bianco, A.M. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules*. 2014 Dec 16;19(12):21127-21153.
163. Ghosh, S.S.; Gehr, T.W.; Ghosh, S. Curcumin and chronic kidney disease (CKD): major mode of action through stimulating endogenous intestinal alkaline phosphatase. *Molecules*. 2014 Dec 2;19(12):20139-20156.
164. Meng, B.; Li, J.; Cao, H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. *Curr Pharm Des*. 2013;19(11):2101-2113.
165. Peddada, K.V.; Peddada, K.V.; Shukla, S.K.; Mishra, A.; Verma, V. Role of Curcumin in Common Musculoskeletal Disorders: a Review of Current Laboratory, Translational, and Clinical Data. *Orthop Surg*. 2015 Aug;7(3):222-231.
166. Kulkarni, S.K.; Dhir, A. An overview of curcumin in neurological disorders. *Indian J Pharm Sci*. 2010 Mar;72(2):149-154.
167. Menon, V.P.; Sudheer, A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:105-125.
168. Sahin Kavakli, H.; Koca, C.; Alici, O. Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2011 Jan;17(1):14-18.
169. Liu, Z.Q.; Xing, S.S.; Zhang, W. Neuroprotective effect of curcumin on spinal cord in rabbit model with ischemia/reperfusion. *J Spinal Cord Med*. 2013 Mar;36(2):147-152.
170. Akar, I.; Ince, I.; Arici, A.; Benli, I.; Aslan, C.; Senol, S.; Demir, O.; Altunkas, F.; Altindeger, N.; Akbas, A. The Protective Effect of Curcumin on a Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury Model. *Ann Vasc Surg*. 2017 Jul;42:285-292.
171. Sanli, A.M.; Turkoglu, E.; Serbes, G.; Sargon, M.F.; Besalti, O.; Kilinc, K.; Irak, A.; Sekerci, Z. Effect of curcumin on lipid peroxidation, early ultrastructural findings and neurological recovery after experimental spinal cord contusion injury in rats. *Turk Neurosurg*. 2012;22(2):189-195.
172. Alvarado-Sanchez, B.G.; Salgado-Ceballos, H.; Torres-Castillo, S.; Rodriguez-Silverio, J.; Lopez-Hernandez, M.E.; Quiroz-Gonzalez, S.; Sanchez-Torres, S.; Mondragon-Lozano, R.; Fabela-Sanchez, O. Electroacupuncture and Curcumin Promote Oxidative Balance and Motor Function Recovery in Rats Following Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurochem Res*. 2019 Feb;44(2):498-506.
173. Jat, D.; Parihar, P.; Kothari, S.C.; Parihar, M.S. Curcumin reduces oxidative damage by increasing reduced glutathione and preventing membrane permeability transition in isolated brain mitochondria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2013 Dec 31;59 Suppl:OL1899-1905.
174. Zhang, N.; Wei, G.; Ye, J.; Yang, L.; Hong, Y.; Liu, G.; Zhong, H.; Cai, X. Effect of curcumin on acute spinal cord injury in mice via inhibition of inflammation and TAK1 pathway. *Pharmacol Rep*. 2017b Oct;69(5):1001-1006.
175. Ni, H.; Jin, W.; Zhu, T.; Wang, J.; Yuan, B.; Jiang, J.; Liang, W.; Ma, Z. Curcumin modulates TLR4/NF-kappaB inflammatory signaling pathway following traumatic spinal cord injury in rats. *J Spinal Cord Med*. 2015 Mar;38(2):199-206.
176. Yuan, J.; Zou, M.; Xiang, X.; Zhu, H.; Chu, W.; Liu, W.; Chen, F.; Lin, J. Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the

- intracellular and extracellular components of glial scar. *J Surg Res.* 2015 May 1;195(1):235-245.
177. Wang, Y.F.; Zu, J.N.; Li, J.; Chen, C.; Xi, C.Y.; Yan, J.L. Curcumin promotes the spinal cord repair via inhibition of glial scar formation and inflammation. *Neuroscience letters.* 2014 Feb 7;560:51-56.
 178. Lin, M.S.; Lee, Y.H.; Chiu, W.T.; Hung, K.S. Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *J Surg Res.* 2011 Apr;166(2):280-289.
 179. Zu, J.; Wang, Y.; Xu, G.; Zhuang, J.; Gong, H.; Yan, J. Curcumin improves the recovery of motor function and reduces spinal cord edema in a rat acute spinal cord injury model by inhibiting the JAK/STAT signaling pathway. *Acta Histochem.* 2014 Oct;116(8):1331-1336.
 180. Bang, W.S.; Kim, K.T.; Seo, Y.J.; Cho, D.C.; Sung, J.K.; Kim, C.H. Curcumin Increase the Expression of Neural Stem/Progenitor Cells and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Korean Neurosurg Soc.* 2018 Jan;61(1):10-18.
 181. Hao, Q.; Wang, H.W.; Yu, Q.; Shen, J.; Zhao, L.; Shi, F.F.; Chen, M.M.; Yang, Y.L. [Effects of curcumin on the recovery of hind limb function after spinal cord injury in rats and its mechanism]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2017 May 8;33(5):441-444.
 182. Son, S.; Kim, K.T.; Cho, D.C.; Kim, H.J.; Sung, J.K.; Bae, J.S. Curcumin Stimulates Proliferation of Spinal Cord Neural Progenitor Cells via a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *J Korean Neurosurg Soc.* 2014 Jul;56(1):1-4.
 183. Gupta, S.C.; Prasad, S.; Kim, J.H.; Patchva, S.; Webb, L.J.; Priyadarsini, I.K.; Aggarwal, B.B. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep.* 2011 Nov;28(12):1937-1955.
 184. Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007 Nov-Dec;4(6):807-818.
 185. Sharma, R.A.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:453-470.
 186. Bisht, S.; Feldmann, G.; Soni, S.; Ravi, R.; Karikar, C.; Maitra, A.; Maitra, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* 2007 Apr 17;5:3.
 187. Tiyafoonchai, W.; Tungpradit, W.; Plianbangchang, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2007 Jun 7;337(1-2):299-306.
 188. Nair, R.S.; Morris, A.; Billa, N.; Leong, C.O. An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2019 Jan 10;20(2):69.
 189. Cole, G.M.; Morihara, T.; Lim, G.P.; Yang, F.; Begum, A.; Frautschy, S.A. NSAID and antioxidant prevention of Alzheimer's disease: lessons from in vitro and animal models. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1035:68-84.
 190. Ormond, D.R.; Shannon, C.; Oppenheim, J.; Zeman, R.; Das, K.; Murali, R.; Jhanwar-Uniyal, M. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *PLoS One.* 2014;9(2):e88916.
 191. Basso, D.M.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995 Feb;12(1):1-21.
 192. Zorner, B.; Filli, L.; Starkey, M.L.; Gonzenbach, R.; Kasper, H.; Rothlisberger, M.; Bolliger, M.; Schwab, M.E. Profiling locomotor recovery: comprehensive

- quantification of impairments after CNS damage in rodents. *Nat Methods*. 2010 Sep;7(9):701-708.
193. Machova Urdzikova, L.; Karova, K.; Ruzicka, J.; Kloudova, A.; Shannon, C.; Dubisova, J.; Murali, R.; Kubinova, S.; Sykova, E.; Jhanwar-Uniyal, M.; Jendelova, P. The Anti-Inflammatory Compound Curcumin Enhances Locomotor and Sensory Recovery after Spinal Cord Injury in Rats by Immunomodulation. *Int J Mol Sci*. 2015 Dec 31;17(1).
 194. Burke, D.A.; Magnuson, D.S. Basso, Beattie, and Bresnahan Scale Locomotor Assessment Following Spinal Cord Injury and Its Utility as a Criterion for Other Assessments #. *T Animal Models of Acute Neurological Injuries II*; 2012. p. 591-604.
 195. Veronez, S.; Assis, L.; Del Campo, P.; de Oliveira, F.; de Castro, G.; Renno, A.C.; Medalha, C.C. Effects of different fluences of low-level laser therapy in an experimental model of spinal cord injury in rats. *Lasers Med Sci*. 2016 Dec 01.
 196. von Leden, R.E.; Cooney, S.J.; Ferrara, T.M.; Zhao, Y.; Dalgard, C.L.; Anders, J.J.; Byrnes, K.R. 808 nm wavelength light induces a dose-dependent alteration in microglial polarization and resultant microglial induced neurite growth. *Lasers Surg Med*. 2013 Apr;45(4):253-263.
 197. Jansen, P.; Giehl, K.; Nyengaard, J.R.; Teng, K.; Lioubinski, O.; Sjoegaard, S.S.; Breiderhoff, T.; Gotthardt, M.; Lin, F.; Eilers, A.; Petersen, C.M.; Lewin, G.R.; Hempstead, B.L.; Willnow, T.E.; Nykjaer, A. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1449-1457.
 198. Shu, X.Q.; Mendell, L.M. Neurotrophins and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Jul 6;96(14):7693-7696.
 199. Aras, R.; Barron, A.M.; Pike, C.J. Caspase activation contributes to astrogliosis. *Brain Res*. 2012 Apr 23;1450:102-115.
 200. Herrera, J.J.; Nestic, O.; Narayana, P.A. Reduced vascular endothelial growth factor expression in contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2009 Jul;26(7):995-1003.
 201. Benton, R.L.; Maddie, M.A.; Gruenthal, M.J.; Hagg, T.; Whittemore, S.R. Neutralizing endogenous VEGF following traumatic spinal cord injury modulates microvascular plasticity but not tissue sparing or functional recovery. *Curr Neurovasc Res*. 2009 May;6(2):124-131.
 202. Nestic, O.; Sundberg, L.M.; Herrera, J.J.; Mokkapati, V.U.; Lee, J.; Narayana, P.A. Vascular endothelial growth factor and spinal cord injury pain. *J Neurotrauma*. 2010 Oct;27(10):1793-1803.
 203. Yoshida, K.; Kakihana, M.; Chen, L.S.; Ong, M.; Baird, A.; Gage, F.H. Cytokine regulation of nerve growth factor-mediated cholinergic neurotrophic activity synthesized by astrocytes and fibroblasts. *J Neurochem*. 1992 Sep;59(3):919-931.
 204. Wu, X.; Moges, H.; DeTaboada, L.; Anders, J. Comparison of the effects of pulsed and continuous wave light on axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. *Lasers Med Sci*. 2012b Mar;27(2):525-528.
 205. Metzler, M.; Pfeiffer, E.; Schulz, S.I.; Dempe, J.S. Curcumin uptake and metabolism. *Biofactors*. 2013 Jan-Feb;39(1):14-20.

206. Tonnesen, H.H. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII. Pharmazie.* 2002 Dec;57(12):820-824.
207. Liu, M.; Teng, C.P.; Win, K.Y.; Chen, Y.; Zhang, X.; Yang, D.P.; Li, Z.; Ye, E. Polymeric Encapsulation of Turmeric Extract for Bioimaging and Antimicrobial Applications. *Macromol Rapid Commun.* 2019 Mar;40(5):e1800216.
208. Jelezova, I.; Drakalska, E.; Momekova, D.; Shalimova, N.; Momekov, G.; Konstantinov, S.; Rangelov, S.; Pispas, S. Curcumin loaded pH-sensitive hybrid lipid/block copolymer nanosized drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* 2015 Oct 12;78:67-78.
209. Yoncheva, K.; Kamenova, K.; Perperieva, T.; Hadjimitova, V.; Donchev, P.; Kaloyanov, K.; Konstantinov, S.; Kondeva-Burdina, M.; Tzankova, V.; Petrov, P. Cationic triblock copolymer micelles enhance antioxidant activity, intracellular uptake and cytotoxicity of curcumin. *Int J Pharm.* 2015 Jul 25;490(1-2):298-307.
210. Cheng, K.K.; Yeung, C.F.; Ho, S.W.; Chow, S.F.; Chow, A.H.; Baum, L. Highly stabilized curcumin nanoparticles tested in an in vitro blood-brain barrier model and in Alzheimer's disease Tg2576 mice. *AAPS J.* 2013 Apr;15(2):324-336.
211. Umerska, A.; Gaucher, C.; Oyarzun-Ampuero, F.; Fries-Raeth, I.; Colin, F.; Villamizar-Sarmiento, M.G.; Maincent, P.; Sapin-Minet, A. Polymeric Nanoparticles for Increasing Oral Bioavailability of Curcumin. *Antioxidants (Basel).* 2018 Mar 24;7(4).
212. Trivedi, M.K.; Mondal, S.C.; Gangwar, M.; Jana, S. Immunomodulatory potential of nanocurcumin-based formulation. *Inflammopharmacology.* 2017 Dec;25(6):609-619.
213. Dende, C.; Meena, J.; Nagarajan, P.; Nagaraj, V.A.; Panda, A.K.; Padmanaban, G. Nanocurcumin is superior to native curcumin in preventing degenerative changes in Experimental Cerebral Malaria. *Sci Rep.* 2017 Aug 30;7(1):10062.
214. Aggarwal, B.B.; Harikumar, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Jan;41(1):40-59.
215. Begum, A.N.; Jones, M.R.; Lim, G.P.; Morihara, T.; Kim, P.; Heath, D.D.; Rock, C.L.; Pruitt, M.A.; Yang, F.; Hudspeth, B.; Hu, S.; Faull, K.F.; Teter, B.; Cole, G.M.; Frautschy, S.A. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jul;326(1):196-208.
216. Chainani-Wu, N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med.* 2003 Feb;9(1):161-168.
217. Bethea, J.R.; Castro, M.; Keane, R.W.; Lee, T.T.; Dietrich, W.D.; Yeziarski, R.P. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci.* 1998 May 1;18(9):3251-3260.
218. Chen, F.; Castranova, V.; Shi, X.; Demers, L.M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 1999 Jan;45(1):7-17.
219. Moon, D.O.; Kim, M.O.; Kang, S.H.; Choi, Y.H.; Kim, G.Y. Sulforaphane suppresses TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB and induces apoptosis through

- activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett.* 2009 Feb 8;274(1):132-142.
220. Xifro, X.; Vidal-Sancho, L.; Boadas-Vaello, P.; Turrado, C.; Alberch, J.; Puig, T.; Verdu, E. Novel epigallocatechin-3-gallate (EGCG) derivative as a new therapeutic strategy for reducing neuropathic pain after chronic constriction nerve injury in mice. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123122.
 221. Cho, N.; Nguyen, D.H.; Satkunendrarajah, K.; Branch, D.R.; Fehlings, M.G. Evaluating the role of IL-11, a novel cytokine in the IL-6 family, in a mouse model of spinal cord injury. *J Neuroinflammation.* 2012 Jun 20;9:134.
 222. Zhang, Y.; Taveggia, C.; Melendez-Vasquez, C.; Einheber, S.; Raine, C.S.; Salzer, J.L.; Brosnan, C.F.; John, G.R. Interleukin-11 potentiates oligodendrocyte survival and maturation, and myelin formation. *J Neurosci.* 2006 Nov 22;26(47):12174-12185.
 223. Pineau, I.; Lacroix, S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol.* 2007 Jan 10;500(2):267-285.
 224. Sato, A.; Ohtaki, H.; Tsumuraya, T.; Song, D.; Ohara, K.; Asano, M.; Iwakura, Y.; Atsumi, T.; Shioda, S. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation.* 2012 Apr 7;9:65.
 225. Cavaillon, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001 Jun;47(4):695-702.
 226. Gerosa, F.; Paganin, C.; Peritt, D.; Paiola, F.; Scupoli, M.T.; Aste-Amezaga, M.; Frank, I.; Trinchieri, G. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med.* 1996 Jun 1;183(6):2559-2569.
 227. Jeannin, P.; Delneste, Y.; Seveso, M.; Life, P.; Bonnefoy, J.Y. IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3159-3165.
 228. Meyaard, L.; Hovenkamp, E.; Otto, S.A.; Miedema, F. IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J Immunol.* 1996 Apr 15;156(8):2776-2782.
 229. Yaguchi, M.; Ohta, S.; Toyama, Y.; Kawakami, Y.; Toda, M. Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration. *J Neurosci Res.* 2008 Jul;86(9):1972-1980.
 230. Wynn, T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):583-594.
 231. Tripathy, D.; Thirumangalakudi, L.; Grammas, P. RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiol Aging.* 2010 Jan;31(1):8-16.
 232. Maheshwari, A.; Janssens, K.; Bogie, J.; Van Den Haute, C.; Struys, T.; Lambrichts, I.; Baekelandt, V.; Stinissen, P.; Hendriks, J.J.; Slaets, H.; Hellings, N. Local overexpression of interleukin-11 in the central nervous system limits demyelination and enhances remyelination. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:685317.

233. Mehler, M.F.; Rozental, R.; Dougherty, M.; Spray, D.C.; Kessler, J.A. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):62-65.
234. Kuang, X.; Huang, Y.; F., G.H.; Y., Z.X. Effects of intrathecal epigallocatechin gallate, an inhibitor of Toll-like receptor 4, on chronic neuropathic pain in rats. 2012 Feb 15;676(1-3):51-56.
235. Seong, K.J.; Lee, H.G.; Kook, M.S.; Ko, H.M.; Jung, J.Y.; Kim, W.J. Epigallocatechin-3-gallate rescues LPS-impaired adult hippocampal neurogenesis through suppressing the TLR4-NF-kappaB signaling pathway in mice. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2016 Jan;20(1):41-51.
236. Youn, H.S.; Saitoh, S.I.; Miyake, K.; Hwang, D.H. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol*. 2006 Jun 28;72(1):62-69.
237. Adachi, N.; Tomonaga, S.; Tachibana, T.; Denbow, D.M.; Furuse, M. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates acute stress responses through GABAergic system in the brain. *Eur J Pharmacol*. 2006 Feb 15;531(1-3):171-175.
238. Haque, A.M.; Hashimoto, M.; Katakura, M.; Tanabe, Y.; Hara, Y.; Shido, O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr*. 2006 Apr;136(4):1043-1047.
239. Soung, H.S.; Wang, M.H.; Tseng, H.C.; Fang, H.W.; Chang, K.C. (-)Epigallocatechin-3-gallate decreases the stress-induced impairment of learning and memory in rats. *Neuroscience letters*. 2015 Aug 18;602:27-32.